

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLAUDEMIR DE SOUZA

DESENVOLVIMENTO DE ANTÍGENOS E ANTICORPOS RECOMBINANTES COM
POTENCIAL AO DIAGNÓSTICO DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO

CURITIBA

2017

CLAUDEMIR DE SOUZA

DESENVOLVIMENTO DE ANTÍGENOS E ANTICORPOS RECOMBINANTES COM
POTENCIAL AO DIAGNÓSTICO DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular, no Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Krieger

Co-Orientador: Prof. Dr. Nilson I. T. Zanchin

CURITIBA
2017

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Souza, Claudemir de

Desenvolvimento de antígenos e anticorpos recombinantes com potencial ao diagnóstico do vírus sincicial respiratório humano. / Claudemir de Souza. – Curitiba, 2017.

152 p. : il. ; 30cm.

Orientador: Marco Aurélio Krieger

Co-orientador: Nilson I. T. Zanchin

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Antígenos. 2. Infecções por Vírus Respiratório Sincicial. I. Título. II. Krieger, Marco Aurélio. III. Zanchin, Nilson I. T. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 616.079

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular


Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

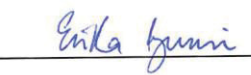
Prof. Dr. Marco Aurélio Krieger
Orientadora e presidente da banca
Fiocruz-Pr

APROVAÇÃO 


Prof. Dr. Luciano Kleber de Souza Luna
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

APPROVAÇÃO 


Profa. Dra. Erika Izumi
Instituto Tecnológico Federal do Paraná

APPROVAÇÃO 

Profa. Dra. Juliana Ferreira de Moura
Universidade Federal do Paraná

APPROVAÇÃO 

Profa. Dra. Daniela Parada Pavoni
Instituto Carlos Chagas

APPROVAÇÃO 

E tendo como suplente,

Prof. Dr. Stênio Perdigão Fragoso
Fiocruz/Pr.

Após arguir o candidato Claudemir de Souza, em relação ao seu trabalho intitulado: "Desenvolvimento de antígenos e anticorpos recombinantes com potencial diagnóstico ao vírus sincicial respiratório humano", são de parecer favorável à APPROVAÇÃO do acadêmico, habilitando-o ao título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 24 de Fevereiro de 2017

Dedico este trabalho ao meu
sobrinho e afilhado
Henrique, por ter me
mostrado a forma mais
pura e sublime do amor.
Iluminando e colorindo os dias
sombrios, me dando
alegria em meio às
frustações e refúgio
diante das tribulações.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força e sabedoria. Aos meus pais pelo incentivo. Ao meu irmão Ronaldo pela companhia, motivação e por acreditar em mim nos momentos em que nem eu mesmo acreditava. Ao meu companheiro Edilson pelo carinho, compreensão e amor. A cada um dos amigos verdadeiros que sofreram e se alegraram comigo;

À CAPES e CNPq, pelo suporte financeiro. Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR, a todos que passaram pelo colegiado e coordenação, em especial à Andrea Senff Ribeiro;

Ao IBMP por confiar este projeto em mim e ao ICC por possibilitar a execução deste. Em especial ao IBMP pelo suporte financeiro após o término da bolsa CAPES;

Ao meu orientador Marco Krieger pela oportunidade e pela confiança depositada em mim, para realização deste projeto tão complexo;

Ao meu coorientador Nilson Zanchin, por ter aceitado me orientar, mesmo sem eu ter nenhuma experiência, por todo o conhecimento, pelo tempo enorme que dedicou ao meu projeto e sobretudo pela confiança;

À Paola Celedon, por ter me treinado em toda a parte prática de bancada, desde pipetagem até a subclonagem, expressão e purificação de proteínas. A Kelly Santos e ao Danilo Eugênio pelas inúmeras ajudas com as purificações no Akta. E ainda ao Danilo pelos cálculos químicos e preparo de soluções;

Ao pessoal do preparo de soluções (Nilson Fidêncio, Sílvia, Tânia, Cibele e Junior);

Ao Giovanni Mazzarotto por toda a ajuda na produção dos anticorpos policlonais;

À farmacêutica Lays do Mãe Curitibana pela doação da alíquota do anticorpo comercial Palivizumabe. Ao LACEN/PR pelas amostras clínicas;

Ao Leonardo Foti e toda a sua equipe (Sandra, Renata e Juliana), pela realização dos ensaios no sistema *Luminex* e pela grande atenção e dedicação que me deram ao longo de todo o experimento. E ainda, ao Leonardo, pela ajuda na obtenção das amostras clínicas;

À Daniela Pavoni que desde o início me recebeu de braços abertos no laboratório e estava sempre pronta para resolver alguns problemas do dia a dia;

À Denise Salmon, pelas várias pequenas ajudas, pelo enorme carinho e atenção, sobretudo pela amizade verdadeira e por estar tão perto, mesmo estando tão longe;

Aos colegas do laboratório, pela companhia e por dividir as frustrações e emoções dos experimentos;

Em especial, à Dr^a Adriana Ludwig, pelo carinho, dedicação e capricho com que me auxiliou/instruiu em todas as análises de sequenciamento, alinhamento, filogenia e redação do manuscrito. Sobre tudo, pela amizade sincera e verdadeira;

E à todos aqueles que de alguma forma colaboraram para que este sonho se tornasse realidade.

O SENHOR é o meu pastor,
nada me faltará.
Deitar-me faz em verdes
pastos, guia-me mansamente a
águas tranquilas.
Refrigera a minha alma;
guia-me pelas veredas da
justiça, por amor do seu nome.
Ainda que eu andasse pelo
vale da sombra da morte, não
temeria mal algum, porque tu
estás comigo; a tua vara e o
teu cajado me consolam.
Preparas uma mesa perante
mim na presença dos meus
inimigos, unges a minha cabeça
com óleo, o meu cálice
transborda.
Certamente que a bondade
e a misericórdia me seguirão
todos os dias da minha vida; e
habitarei na casa do Senhor
por longos dias.

(Salmos 23:1-6)

RESUMO

O vírus sincicial respiratório humano (HRSV) é o principal causador de infecções respiratórias agudas, incluindo pneumonia e bronquiolite em recém-nascidos e crianças pequenas; pode acometer também idosos, transplantados e pacientes imunocomprometidos. Atualmente, nenhum tratamento terapêutico eficaz ou vacina contra esta doença está disponível. Sua alta relevância reforça a necessidade do desenvolvimento de um método de diagnóstico que seja capaz de detectar o vírus logo após o surgimento dos primeiros sintomas. Porém, deve-se levar em conta as características genéticas, que é um dos fatores limitantes dos ensaios imunológicos de detecção. O HRSV é um vírus RNA⁽⁻⁾ de cadeia simples que codifica onze proteínas. Dados da literatura indicam que as proteínas do envelope F1 e G, e a proteína do nucleocapsídeo (N), são as que apresentam maior potencial imunogênico. As sequências codificadoras destas proteínas foram utilizadas na construção de vetores de expressão para obtenção dos seus respectivos antígenos recombinantes em *Escherichia coli*. Após a purificação por cromatografia de afinidade e troca iônica, estes antígenos foram utilizados para obtenção de anticorpos policlonais em camundongos. Foi produzido também um fragmento sintético de anticorpo do tipo Fab em *Pichia pastoris*, que reconhece a proteína F1 do HRSV. A capacidade dos anticorpos policlonais e do fragmento Fab para detectar seus respectivos antígenos recombinantes ou nativos em *swabs* nasofaríngeal, foram avaliadas pelos ensaios de ELISA, *Luminex* e *Western blot*. Através dos ensaios de ELISA e *Luminex* não foi possível detectar os antígenos vírais nas amostras clínicas para nenhuma das condições testadas. Porém, nos ensaios de *Western blot* foi possível detectar tanto o antígeno F1 recombinante quanto os antígenos nativos, quando presentes nas amostras clínicas. Este ensaio demonstrou que o fragmento Fab recombinante está funcional e que possui a mesma capacidade para reconhecer o antígeno que o anticorpo monoclonal completo, o qual foi usado como referência nos experimentos. O fragmento Fab pode ser usado eficientemente em muitos tipos de testes diagnósticos baseados na captura de partículas virais, que são os recomendados para a fase aguda desta infecção.

Palavras-chave: HRSV. Fragmento Fab. Imunodiagnóstico. Detecção de antígenos.

ABSTRACT

The human respiratory syncytial virus (HRSV) is the main cause of acute respiratory infections, including pneumonia and bronchiolitis in infants and young children, but can also affect vulnerable adults, elderly, transplanted and immunocompromised patients. Currently, no effective treatment or vaccine against this disease is available, and its high relevance enforces the necessity of the development of a diagnostic method capable of detecting the virus, as soon as the first symptoms appear and according to its genetic characteristics, which is one of the limiting factors of immunological detection assays. HRSV is a single stranded RNA⁽⁻⁾ virus encoding only 11 proteins. The literature indicates that the envelope proteins F1 and G and the nucleocapsid protein (N) are the major immunogenic proteins. The coding sequences of these proteins were used to construct expression vectors from which their respective recombinant antigens were produced in *Escherichia coli*. After purification affinity and ion exchange chromatography, these antigens were used to obtain polyclonal antibodies in mice. A synthetic fragment of a Fab-type antibody that recognizes HRSV F1 protein was also produced in *Pichia pastoris*. The capacity of the polyclonal and the Fab fragment to detect their respective recombinant or native antigens, from nasopharyngeal swabs, was evaluated by ELISA, Luminex system and Western blot assays. The ELISA and Luminex assays fail to detect the viral antigens in the clinical samples in all tested conditions. However, with Western blot assays, it was possible to detect both, the recombinant F1 and the native antigens when present in the clinical samples. Through these assays it was possible to demonstrate that the recombinant Fab fragment is functional and has the same ability to recognize antigens as the complete monoclonal antibody, which was used as a control in the experiments. This fragment can be efficiently used in many types of diagnostic tests based on the capture of viral particles which are recommended for the acute phase of infection.

Key-words: HRSV. Fab fragment. Immunodiagnosis. Antigen detection.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESQUEMA DO GENOMA DO HRSV	21
FIGURA 2 – ESQUEMA DA ESTRUTURA DO VÍRUS HRSV E AS DIFERENTES PROTEÍNAS QUE O COMPÕE	22
FIGURA 3 – DIAGRAMA DA PROTEÍNA HRSV-F	23
FIGURA 4 – MODELO COMPUTACIONAL DA ESTRUTURA DA PROTEÍNA HRSV-F	24
FIGURA 5 – DIAGRAMA DA PROTEÍNA HRSV-G	25
FIGURA 6 - ETIOLOGIA DAS INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS EM CRIANÇAS.....	26
FIGURA 7 – MAPA DO VETOR PARA A EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES DO HRSV.....	38
FIGURA 8 – MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO UTILIZADO NA PRODUÇÃO DAS CADEIAS LEVES DO FRAGMENTO FAB RECOMBINANTE (FABL).....	43
FIGURA 9 – MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO UTILIZADO NA PRODUÇÃO DAS CADEIAS PESADAS DO FRAGMENTO FAB RECOMBINANTE (FABH)	44
FIGURA 10– ESQUEMA DAS DIFERENTES COMBINAÇÕES DE MOLÉCULAS NOS ENSAIOS DE ELISA	64
FIGURA 11– ESQUEMA DAS MOLÉCULAS E DO LEITOR DO SISTEMA <i>LUMINEX</i>	68
FIGURA 12– SUBCLONAGEM DOS ANTÍGENOS DE HRSV NO VETOR DE EXPRESSÃO pET28A	73
FIGURA 13– ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO 10-1 (HRSV-F1).....	73
FIGURA 14– ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO 10-2 (HRSV-F2).....	74
FIGURA 15– ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO 10-3 (FRAGMENTO DO HRSV-F1)	74
FIGURA 16– ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO 10-4 (HRSV-G).....	75

FIGURA 17– ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO 10-5 (HRSV-N)	76
FIGURA 18– EFEITO DA TEMPERATURA NA SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO HRSV.....	77
FIGURA 19– EFEITO DA TEMPERATURA NA SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO HRSV.....	78
FIGURA 20– EFEITO DA TEMPERATURA NA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO HRSV.....	79
FIGURA 21– CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS DO HRSV EM <i>E. coli</i>	80
FIGURA 22– SOLUBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA HRSV-F1 DOS CORPOS DE INCLUSÃO.....	81
FIGURA 23– TESTES DE SOLUBILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS HRSV-F2 E FRAG. F1 DOS CORPOS DE INCLUSÃO DE <i>E. coli</i>	82
FIGURA 24– TESTES DE PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS DO HRSV	83
FIGURA 25– TESTES DE PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS HRSV-G E HRSV-N	83
FIGURA 26– TESTES DE PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS DO HRSV	84
FIGURA 27– TESTES DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HRSV-G COM A ETIQUETA 6XHIS FUSIONADA NA EXTREMIDADE C-TERMINAL	85
FIGURA 28– TESTE DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HRSV-F1 SOLUBILIZADA DOS CORPOS DE INCLUSÃO.....	86
FIGURA 29– TESTE DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HRSV-F1 SOLUBILIZADA DOS CORPOS DE INCLUSÃO.....	87
FIGURA 30– PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PURIFICAÇÃO DE AFINIDADE	87
FIGURA 31– PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PURIFICAÇÃO DE TROCA IÔNICA.....	88
FIGURA 32– ETAPAS CROMATOGRÁFICAS DA PROTEÍNA HRSV-N NO SISTEMA AKTA	89
FIGURA 33– CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DA PROTEÍNA HRSV-N	89
FIGURA 34– ETAPAS CROMATOGRÁFICAS DA PROTEÍNA HRSV-G NO SISTEMA AKTA	90
FIGURA 35– CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE DA PROTEÍNA HRSV-F1 SOLUBILIZADA DOS CORPOS DE INCLUSÃO	91

FIGURA 36– TESTES DE SOLUBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA HRSV-F1	92
FIGURA 37– QUANTIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS	93
FIGURA 38– CONFIRMAÇÃO DA OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS	94
FIGURA 39– ANÁLISE DA OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS	94
FIGURA 40– ANÁLISE DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS.....	95
FIGURA 41– ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS DO LAVADO PERITONEAL.....	96
FIGURA 42– TESTES DE PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-HRSV	97
FIGURA 43– CONFIRMAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES POR PCR.....	99
FIGURA 44– ESQUEMAS DOS VETORES PARA EXPRESSÃO DO FRAGMENTO Fab DO ANTICORPO ANTI-F	99
FIGURA 45– CONFIRMAÇÃO DA SUBCLONAGEM DOS GENES CODIFICANTES DOS FRAGMENTOS Fab	100
FIGURA 46– SUBCLONAGEM DOS GENES DO FRAGMENTO Fab NOS VETORES DE EXPRESSÃO EM <i>P. pastoris</i>	101
FIGURA 47– PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO EM <i>P.</i> <i>pastoris</i>	102
FIGURA 48– CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS FRAGMENTOS Fab.....	103
FIGURA 49– CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS CADEIAS LEVES E PESADAS DOS FRAGMENTOS Fab POR ENSAIOS DE <i>WESTERN</i> <i>BLOT</i>	104
FIGURA 50– TESTES DE EXPRESSÃO DO FRAGMENTO FAB EM <i>P. pastoris</i>	105
FIGURA 51- ANÁLISE DA INTERAÇÃO ANTÍGENO-ANTICORPO	106
FIGURA 52– TESTE DE ESTABILIDADE DO FRAGMENTO Fab	107
FIGURA 53– TESTES DE PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO Fab	108
FIGURA 54– TESTES DE PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO Fab	108
FIGURA 55– TESTES DE PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO Fab	109
FIGURA 56– ETAPAS DA PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO Fab NO AKTA	109
FIGURA 57– CONJUGAÇÃO DOS ANTICORPOS COM A ENZIMA PEROXIDASE	111

FIGURA 58– ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DO FRAGMENTO Fab NA PLATAFORMA <i>LUMINEX</i>	113
FIGURA 59- ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DO PALIVIZUMABE NA PLATAFORMA <i>LUMINEX</i>	113
FIGURA 60- ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS NA PLATAFORMA <i>LUMINEX</i>	114
FIGURA 61– ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DOS ANTICORPOS ATRAVÉS DA PLATAFORMA ELISA.....	114
FIGURA 62– ENSAIOS DE INTERAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES COM SEUS RESPECTIVOS ANTICORPOS ATRAVÉS DO ELISA	115
FIGURA 63- ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DOS ANTICORPOS ATRAVÉS DE <i>WESTERN BLOT</i>	117
FIGURA 64- ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DOS ANTICORPOS ATRAVÉS DE <i>WESTERN BLOT</i>	117
FIGURA 65- ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DOS ANTICORPOS ATRAVÉS DE <i>WESTERN BLOT</i>	118
FIGURA 66- ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DOS ANTICORPOS ATRAVÉS DE <i>WESTERN BLOT</i>	118

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DIFERENTES TESTES DE DIAGNÓSTICOS COMERCIAIS PARA O HRSV E SEUS RESPECTIVOS FORNECEDORES	31
TABELA 2 – PROTEÍNAS DE HRSV SELECIONADAS PARA OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES	37
TABELA 3 – PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS ANTÍGENOS DO HRSV	41
TABELA 4 - SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS Fab DO PALIVIZUMABE E MOTAVIZUMABE	44
TABELA 5 - OLIGONUCLEOTÍDEOS E SONDAS USADOS PARA DETECÇÃO DOS VÍRUS RESPIRATÓRIOS PELO LACEN/PR	60
TABELA 6 - PAINEL DE AMOSTRAS CLÍNICAS CEDIDOS PELO LACEN/PR PARA VALIDAÇÃO DOS ANTICORPOS NOS IMUNOENSAIOS.....	61
TABELA 7 - DIFERENTES COMBINAÇÕES DE MOLÉCULAS DOS ENSAIOS ELISA	65
TABELA 8 - DIFERENTES COMBINAÇÕES DE ANTICORPOS REALIZADOS NOS ENSAIOS DO SISTEMA <i>LUMINEX</i>	66
TABELA 9 - AMOSTRAS CLÍNICAS UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE <i>WESTERN BLOT</i>	69
TABELA 10 -MELHORES CONDIÇÕES PARA EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES DO HRSV EM <i>E. coli</i>	78
TABELA 11 -RENDIMENTO DOS ANTÍGENOS DO HRSV OBTIDOS EM <i>E. coli</i> .	93
TABELA 12 -MOLÉCULAS SINTÉTICAS DESENVOLVIDAS PARA VALIDAÇÃO NOS IMUNOENSAIOS PARA DIAGNOSTICAR O HRSV	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	- Grau Celsius
µg	- Micrograma
µL	- Microlitro
µm	- Micrómetro
6xHis	- Sequência de seis moléculas do aminoácido histidina
aa	- Aminoácidos
Anti-His	- Anticorpo contra a etiqueta polihistidina
AOX	- Alcohol Oxidase
AP	- Alkaline Phosphatase
BamHI	- Enzima de restrição do tipo II isolada de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BCIP	- Bromo-Chloro-Indolyl Phosphate
Bgl II	- Enzima de restrição do tipo II isolada de <i>Bacillus globigii</i>
BMGY	- Buffered Glycerol-complex Medium
BMMY	- Buffered Methanol-complex Medium
BSA	- Bovine serum albumin
CAPS	- 3-(Cyclohexylamino)-1-PropaneSulfonic Acid
CDR	- Complementarity-Determining Regions
Células T	- Linfócitos Timo-dependentes
CEUA	- Comitê de Ética no Uso de Animal
CH	- Cadeia Pesada
CL	- Cadeia Leve
c-Myc	- Pequeno polipeptídeo formado pelos aminoácidos EQKLISEEDL
CT	- Ciclo Thresbold
C-terminal	- Carboxi-terminal
CV	- Column volume
DNA	- Deoxyribonucleic Acid
DO	- Densidade Óptica
DTT	- Dithiothreitol
E.U.A.	- United States of America
EcoRI	- Enzima de restrição isolada de <i>E. coli</i>
EDC-HCl	- N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodimide-Hydrochloride
EDTA	- EthyleneDiamine Tetraacetic Acid

ELISA	- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Fab	- Fragment Antigen-Binding
Fc	- Fragment crystallizable
FDA	- Food and Drug Administration
FITC	- Fluorescein Isothiocyanate
FLAG	- Pequeno polipeptídeo formado pelos aminoácidos DYKDDDDK
Frag.	- Fragmento
g	- Grama
GFP	- Green Fluorescent Protein
HindIII	- Enzima de restrição do tipo III isolada de <i>Haemophilus influenzae</i>
His4	- Histidinoldehidrogenase
HMPV	- Human Metapneumovirus
HP	- High Performance
HR-C	- Heptad Repeats C-terminal
HR-N	- Heptad Repeats N-terminal
HRP	- HorseRadish Peroxidase
HRSV	- Human Respiratory Syncytial Virus
HRSV-F1	- Subunidade 1 da proteína de fusão do envelope do HRSV
HRSV-F2	- Subunidade 2 da proteína de fusão do envelope do HRSV
HRSV-G	- Proteína de adsorção do envelope do HRSV
HRSV-N	- Proteína do nucleocapsídeo do HRSV
HSA	- Human Serum Albumin
HVR	- Hypervariable Region
IF	- Imunofluorescência
IgA	- Imunoglobulina do tipo A
IgG	- Imunoglobulina do tipo G
IMAC	- Immobilized Metal Affinity Chromatography
IPTG	- Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IRA	- Infecção Respiratória Aguda
kDa	- kiloDalton
LACEN/PR	- Laboratório Central do Estado do Paraná
LB	- Lysogeny Broth
M	- Massa molar expressa em gramas
mA	- Miliampereagem

mAb	- Monoclonal Antibody
MES	- 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid
MFI	- Median Fluorescence Intensity
mg	- Miligrama
mL	- Mililitro
mM	- Milésima parte do Mol
mm	- Milímetro
Mut	- Methanol utilization
MWCO	- Molecular-Weight CutOff
NBT	- Nitro Blue Tetrazolium
NCBI	- National Center for Biotechnology Information
ng	- Nanograma
Ni-NTA	- Níquel-Nitrilotriacetic Acid
nm	- Nanômetro
NotI	- Enzima de restrição isolada de <i>Nocardia otitidis-caviarum</i>
N-terminal	- Amino-terminal
p/v	- peso/volume
PBS	- Phosphate Buffered Saline
PBS-T	- Phosphate Buffered Saline-Tween-20
PBS-TBN	- Phosphate Buffered Saline-Tween, BSA e Sodium Azide
PCR	- Polymerase Chain Reaction
pH	- potencial Hidrogeniônico
PMSF	- Phenylmethylsulfonyl fluoride
pNPP	- para-Nitrophenylphosphate
psi	- pound force per square inch
qRT-PCR	- Real Time quantitative PCR
RADT	- Rapid Antigen Detection Test
RNA	- Ribonucleic Acid
rpm	- Rotações por minuto
RT-PCR	- Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
SacI	- Enzima de restrição isolada de <i>Streptomyces achromogenes</i>
SDS-PAGE	- Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
Sulfo-NHS	- Sulfo-N-hydroxysuccinimide
TBS	- Tris-Buffered Saline

XbaI	- Enzima de restrição isolada de <i>Xanthomonas badrii</i>
xg	- unidade de medida da força relativa da centrifugação
YNB	- Yeast Nitrogen Base
YPD	- Yeast extract – Peptone – Dextrose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	CARACTERÍSTICAS E CLASSIFICAÇÃO DO HRSV	21
1.2	EPIDEMIOLOGIA E VARIABILIDADE GENÉTICA	25
1.3	QUADRO CLÍNICO DA INFECÇÃO.....	28
1.4	PREVENÇÃO, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO.....	30
1.5	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS NO DIAGNOSTICO DO HRSV	33
2	OBJETIVOS.....	35
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES	36
3.1.1	Obtenção das sequências gênicas e subclonagem.....	36
3.1.2	Ensaio para padronização da expressão em sistema bacteriano.....	39
3.1.3	Preparo dos extratos.....	40
3.1.4	Solubilização dos corpos de inclusão.....	42
3.2	EXPRESSÃO DOS ANTICORPOS RECOMBINANTES	42
3.2.1	Construção dos vetores para expressão do fragmento Fab	42
3.2.2	Transformação de <i>P. pastoris</i> e seleção da inserção de múltiplas cópias	46
3.2.3	Ensaio para padronização da expressão em sistema eucarioto.....	47
3.2.4	Recuperação dos Fab recombinantes.....	48
3.3	ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO	49
3.3.1	Testes de purificação em bancada	49
3.3.2	Cromatografia de afinidade em sistema ÄKTA.....	52
3.3.3	Cromatografia de troca iônica no sistema ÄKTA	53
3.3.4	Cromatografia por gel filtração	53
3.4	ANÁLISE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	54
3.4.1	SDS-PAGE.....	54
3.4.2	Western Blot	55
3.4.3	Quantificação de proteínas	56
3.5	OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS	56

3.5.1	Imunização dos camundongos e obtenção dos soros	56
3.5.2	Análise dos anticorpos policlonais do soro e lavado peritoneal	57
3.5.3	Purificação dos anticorpos policlonais	58
3.6	VALIDAÇÃO DOS ANTÍGENOS E ANTICORPOS	58
3.6.1	Conjugação dos anticorpos com peroxidase	62
3.6.2	Ensaio de ELISA	63
3.6.3	Ensaio no sistema <i>Luminex</i>	65
3.6.4	Ensaio de <i>Western blot</i> com amostras clínicas	68
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1	DESENVOLVIMENTO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES	72
4.1.1	Construção dos vetores para expressão em <i>E. coli</i>	72
4.1.2	Testes de expressão	76
4.1.3	Padronização das técnicas cromatográficas	82
4.2	ANÁLISE E PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS	93
4.3	DESENVOLVIMENTO DOS ANTICORPOS RECOMBINANTES	97
4.3.1	Obtenção dos vetores para expressão em Levedura	98
4.3.2	Testes de indução da expressão em levedura	101
4.3.3	Purificação dos fragmentos Fab secretados	108
4.3.4	Obtenção dos anticorpos conjugados com peroxidase	110
4.4	ENSAIOS IMUNOLÓGICOS	112
4.5	VARIABILIDADE GENÉTICA APLICADA AO IMUNODIAGNOSTICO	121
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	125
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
	ANEXO 1	138
	ANEXO 2	141
	ANEXO 3	142

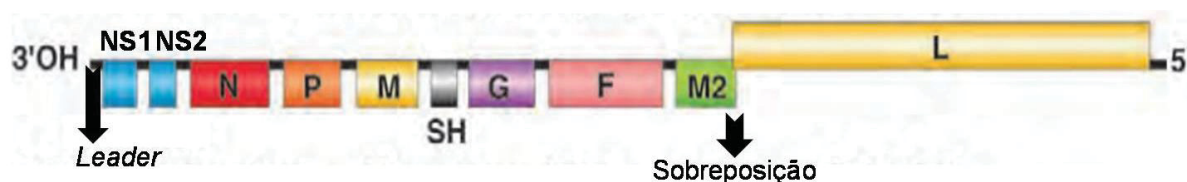
1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS E CLASSIFICAÇÃO DO HRSV

O vírus sincicial respiratório humano (HRSV) foi isolado pela primeira vez em 1956 a partir de um chimpanzé de laboratório com uma doença no trato respiratório superior. Foi rapidamente determinado como sendo de origem humana e o principal causador das infecções respiratórias agudas (IRA), incluindo pneumonia e bronquiolite em recém-nascidos e crianças pequenas (BURAPHACHEEP; BRITT; SULLENDER, 1997; COLLINS; POLLARD, 2002; COLLINS; GRAHAM, 2008), causa comum da morbidade em idosos (BATONICK; WERTZ, 2011; SAWADA; KOMASE; NAKAYAMA, 2011; WU et al., 2012); podendo ainda acometer transplantados (BRANIGAN et al., 2005) e pacientes imunocomprometidos (BURAPHACHEEP; BRITT; SULLENDER, 1997; LIMA et al., 2012; SALTER; LAOI; CROWLEY, 2011; WU et al., 2012).

O HRSV pertence a ordem *Mononegavirales*, família *Pneumoviridae* e gênero *Orthopneumovirus* (AFONSO et al., 2016), sendo um vírus envelopado de RNA simples fita de polaridade negativa (-ssRNA) (HACKING; HULL, 2002). Seu genoma é composto por aproximadamente 15.200 nucleotídeos que formam 10 genes codificantes de 11 proteínas diferentes (FIGURA 1) (BATONICK; WERTZ, 2011; LEVELY et al., 1991), das quais 8 são estruturais (ASENJO et al., 2012). A transcrição do genoma viral é desencadeada assim que o nucleocapsídeo entra no citoplasma da célula hospedeira e requer a ação coordenada de pelo menos quatro proteínas virais (N, P, L e M2-1) (CANE, 2007).

FIGURA 1 – ESQUEMA DO GENOMA DO HRSV

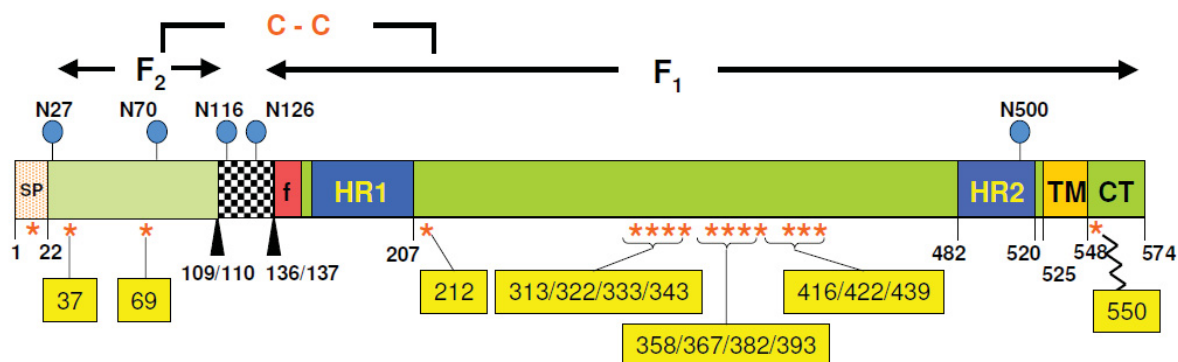


Genes codificantes das proteínas que compõem o vírus. As proteínas NS1, NS2, N, P, M2 e L são proteínas do nucleocapsídeo. A proteína M compõe a matriz viral e as proteínas F, G e SH são glicoproteínas do envelope. *Leader* é a sequência de iniciação da transcrição. A seta mostra a região de sobreposição dos genes codificantes para a M2 e L. FONTE: Adaptado de Fauquet et al. (2005).

do vírus com a membrana da célula hospedeira, permitindo a entrada do genoma viral no citoplasma (BATONICK; WERTZ, 2011) e também, para a fusão das membranas de células infectadas com células sadias, formando um sincício, etapa essencial do ciclo infectivo do vírus (HACKING; HULL, 2002).

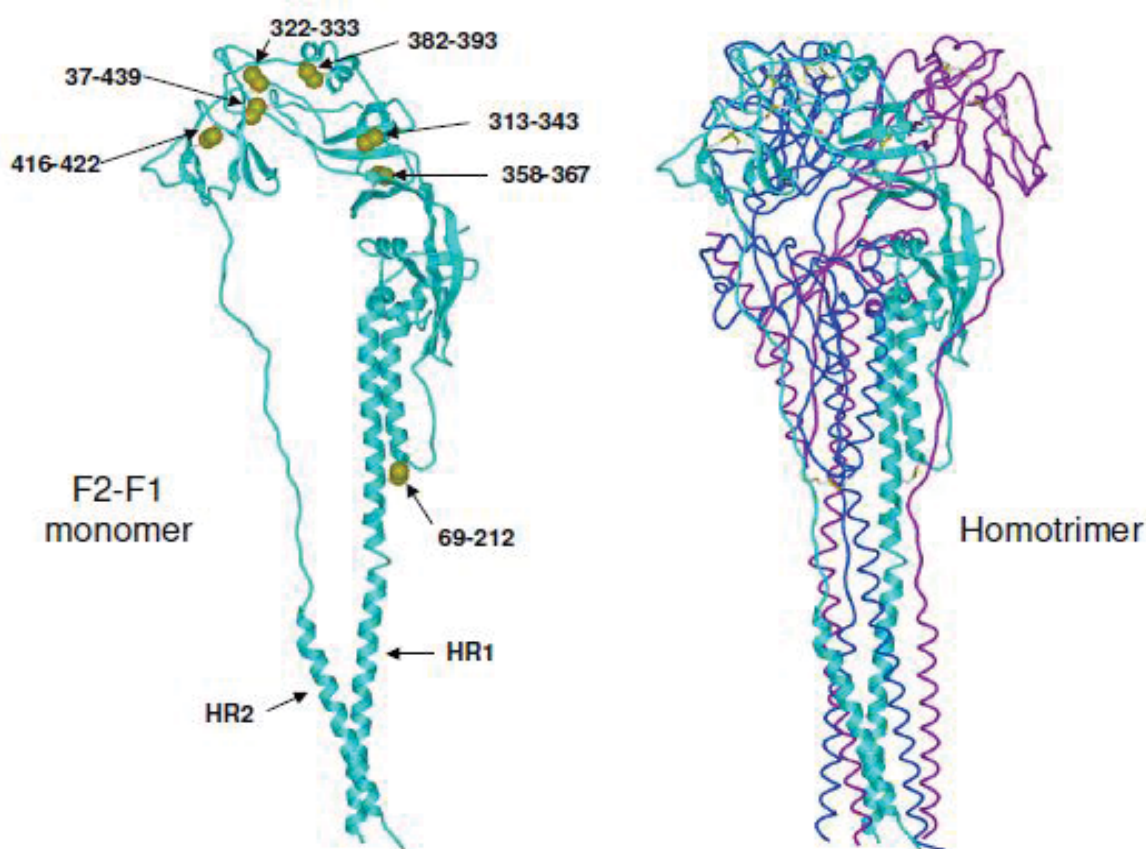
A proteína F é altamente conservada entre a família *Pneumoviridae*, sendo sintetizada como um precursor de 67 kD ao qual sofre clivagem proteolítica, gerando duas subunidades (F1, da extremidade C-terminal e F2, da extremidade N-terminal) ligadas por pontes dissulfeto. A parte da proteína F que entra na membrana celular está situada no N-terminal da subunidade F1, ao passo que o segmento transmembrana está localizado próximo ao C-terminal (FIGURA 3) (HACKING; HULL, 2002). Entre essas regiões estão duas sequências repetidas de sete aminoácidos, chamados respectivamente de HR-N e HR-C, que formam trímeros *hairpins-like* estáveis (CANE, 2007) (FIGURA 4). Estas estruturas sofrem um rearranjo conformacional durante a entrada do vírus na célula, de forma que as membranas viral e celular, de lados opostos se fundam, permitindo a entrada do nucleocapsídeo na célula hospedeira alvo (HACKING; HULL, 2002).

FIGURA 3 – DIAGRAMA DA PROTEÍNA HRSV-F



Representação linear do precursor da proteína de fusão do HRSV. As posições dos aminoácidos de domínios individuais estão indicadas com os resíduos enumerados ao longo do esquema. Pontes dissulfeto que ligam as subunidades F1 e F2 estão representadas com as setas pretas. Sítios de clivagem estão indicados pelas pontas de setas. O local da clivagem está representado pela região quadriculada. Posições dos resíduos individuais de cisteínas estão indicadas pelos asteriscos. Resíduos de asparagina (N116 e N126), locais de glicosilação *N-linked*, estão representados com círculos azuis. SP) Peptídeo sinal, f) Peptídeo de fusão, HR1) *Heptad repeat 1*; HR2) *Heptad repeat 2*; TM) Domínio transmembrana, CT) Domínio citoplasmático. FONTE: Day et al.(2006).

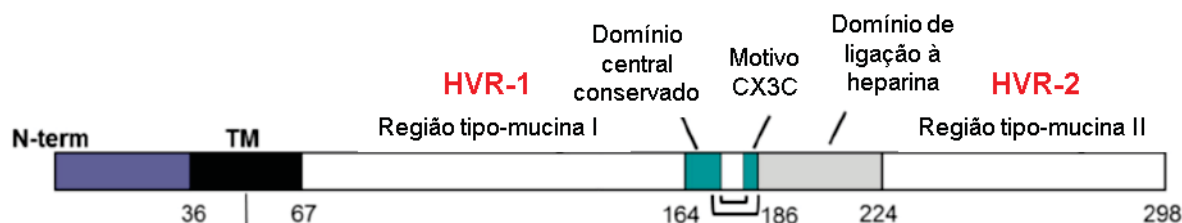
FIGURA 4 – MODELO COMPUTACIONAL DA ESTRUTURA DA PROTEÍNA HRSV-F



Estrutura molecular da proteína F baseada na proteína de fusão do vírus parainfluenza. Diagrama do monômero da proteína F1-F2 (Esquerda) e homotrímero da proteína F (Direita). *Heptad repeat 1* (HR1) e *Heptad repeat 2* (HR2) estão indicadas com as setas. Resíduos de cisteínas estão representados pelas esferas amarelas. FONTE: Day et al. (2006).

A proteína G é importante para o contato e adesão do HRSV com a membrana da célula hospedeira (CANE, 2007; HANDFORTH; FRIEDLAND; SHARLAND, 2000; SMITH; LAWRENCE; COLMAN, 2002), sendo necessária para a infecção *in vivo* (BATONICK; WERTZ, 2011). É uma glicoproteína transmembrana tipo II, que contém um domínio citoplasmático (aa 1–38), um domínio transmembrana (aa 38–66) e um ectodomínio (aa 66–298) (FIGURA 5) (BOTOSSO et al., 2009). O ectodomínio é composto por duas regiões hipervariáveis do tipo mucina (HVR1 e HVR2), que contêm altas proporções de prolina, treonina e serina (WERTZ et al., 1985) e são altamente glicosiladas, com açúcares N e O-ligados. As HVRs são separadas por uma região não glicosilada, altamente conservada (aa 151–190), contendo quatro cisteínas ligadas por pontes dissulfeto, formando um laço, que pressupõe ser o sítio de interação com o receptor da célula hospedeira (CANE, 2007).

FIGURA 5 – DIAGRAMA DA PROTEÍNA HRSV-G



Representação linear da glicoproteína G do HRSV. N-Term) Extremidade amino-terminal da proteína. HVR1 e HVR2) Representação das duas regiões tipo mucina, altamente variável e glicosilada. Em roxo está representado o domínio citoplasmático. Em preto está representado o domínio transmembrana. Em verde está representado o domínio central conservado, indicando abaixo as duas pontes dissulfeto. Os resíduos de aminoácidos referentes aos diferentes domínios da proteína G estão enumerados ao longo da parte inferior do esquema. FONTE: Adaptado de McLellan (2013).

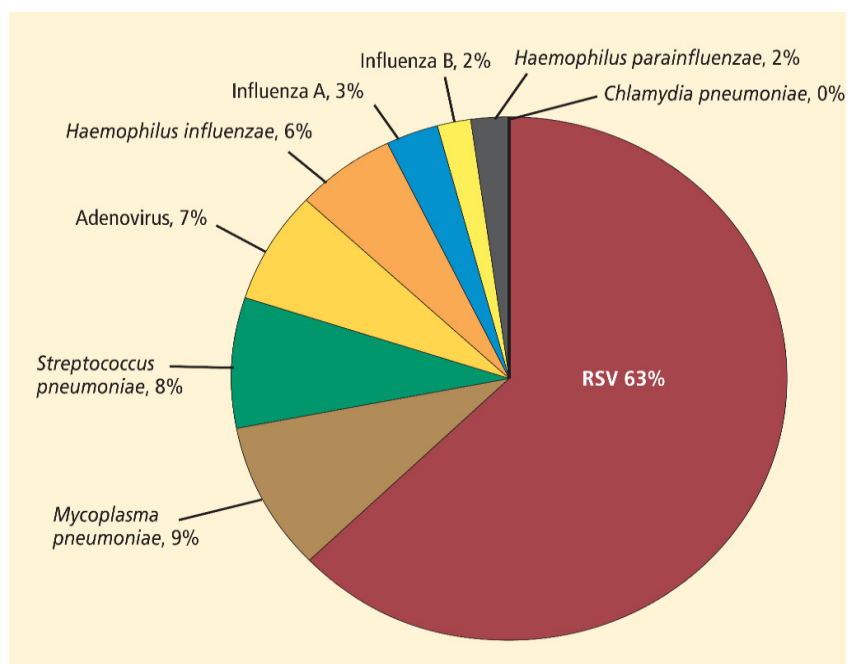
As duas regiões altamente variáveis estão sob seleção positiva e contêm múltiplos epítomos que são reconhecidos por anticorpos monoclonais murinos e humanos (CUI et al., 2013; KATZOV-ECKERT et al., 2012). A alta variabilidade genética e antigênica, principalmente da região HVR2, possibilitou ao HRSV se tornar um ótimo modelo de estudo do relacionamento entre o progresso epidemiológico e a evolução de patógenos (CANE, 2007).

1.2 EPIDEMIOLOGIA E VARIABILIDADE GENÉTICA

Os casos de infecções por HRSV ainda são altos em todo o mundo, particularmente entre as crianças, que durante o primeiro ano de vida não são adequadamente protegidas contra este vírus (PIEDIMONTE, 2015). Na maioria das pessoas a infecção ocorre na via respiratória superior. Porém, em crianças pequenas e adultos vulneráveis, esta infecção atinge as vias respiratórias inferiores, podendo resultar em pneumonia, bronquiolite e morte (BEELER; EICHELBERGER, 2013; VAN REMMERDEN et al., 2012). A Organização Mundial da Saúde estima que globalmente, mais de 60% das infecções respiratórias agudas em crianças são causadas pelo HRSV (FIGURA 6). Dentre estas, é responsável por mais de 80% das infecções nas vias respiratórias inferiores em lactentes menores de 1 ano, durante o pico da estação viral (PIEDIMONTE; PEREZ, 2014); é portanto, a causa mais frequente de bronquiolite e pneumonia. Supõe-se que até 2% dos lactantes com esta infecção requerem hospitalização com suporte respiratório e cerca de 1,5% entram em óbito. Os fatores de risco para desenvolver a forma grave da doença incluem

prematuridade no nascimento, displasia broncopulmonar, doença cardiopulmonar e imunodeficiência. Embora não cause morbidade significativa para adultos saudáveis, pode ser grave para idosos e pacientes imunossuprimidos e transplantados (COLLINS; POLLARD, 2002).

FIGURA 6 - ETIOLOGIA DAS INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS EM CRIANÇAS



FONTE: Piedimonte (2015).

Não existem relatos precisos e atualizados sobre o número de infecções por HRSV (CAMPBELL; BONT; NAIR, 2015). Um estudo de Nair e colaboradores (2010) relatou para o ano de 2005 uma estimativa de aproximadamente 33,8 milhões de infecções infantis em todo o mundo, com o número de mortes entre 66.000 a 199.000, em crianças abaixo de cinco anos de idade, e ocorrendo principalmente nos países em desenvolvimento.

O HRSV é um dos agentes patogênicos mais contagiosos em humanos. É facilmente introduzido e se espalha com facilidade nos lares, hospitais e demais locais com aglomerações de pessoas. Isso contribui para a elevada infecciosidade, causando epidemias anuais, geralmente no inverno. Devido à sua grande variabilidade genética, pode causar altas taxas de reinfecções, consequentemente, surtos epidêmicos (COLLINS; GRAHAM, 2008; PRETORIUS et al., 2013).

Com base em ensaios com anticorpos monoclonais contra as proteínas F e G, foram descritos dois subgrupos do HRSV (A e B) (MUFSON et al., 1985), os quais cocirculam em todo o mundo (BRANIGAN et al., 2005), sendo distinguíveis geneticamente e sorologicamente (GAUNT et al., 2011). O desenvolvimento do RT-PCR, a partir dos anos 80, juntamente com o sequenciamento de DNA, proporcionou uma quantidade muito grande de dados de sequências nucleotídicas, permitindo desta forma a comparação das sequências genéticas de isolados virais do mundo todo (CANE, 2007). Com base nestes dados, surgiu uma classificação adicional dos grupos iniciais do HRSV, com base na variação antigênica e genética da região HVR2 da proteína G (KATZOV-ECKERT et al., 2012). Dados mais recentes relatam a existência de 14 genótipos para o HRSV-A, sendo: GA1-GA7, SAA1, NA1-NA4, ON1CB-A e 25 para o HRSV-B, sendo: GB1-GB5, SAB1-SAB4, URU1 e URU2, BA1-BA12, CB1 e BA-C (HU et al., 2017; ZHENG et al., 2017). O surgimento de novos genótipos podem facilitar a evasão do HRSV da imunidade adquirida em infecções prévias com outros genótipos, podendo influenciar na severidade da doença e causar novos surtos (CUI et al., 2013).

Análises da proteína G de isolados do HRSV de diversos países têm mostrado divergência de aminoácidos de 47% entre os subgrupos A e B (JOHNSON et al., 1987). Essa grande divergência se deve principalmente à diferenças na HVR2, que pode sofrer substituições de aminoácidos, inserções, deleções e duplicações, assim como mudanças na taxa de utilização de códons (CUI et al., 2013; ZLATEVA et al., 2005). Estas modificações estão envolvidas na variação do comprimento da proteína G, que pode variar de 297-321 para o HRSV-A e de 290 para 319 para o HRSV-B (CUI et al., 2013).

A capacidade da proteína G para hospedar inserções longas sem prejudicar sua função está relacionada ao relaxamento estrutural do domínio tipo mucina, que determina mudanças evolutivas rápidas e contribui para a patogenicidade do HRSV e outros vírus com genoma de RNA negativo que codificam esse domínio (MOURA et al., 2013). Estas substituições podem modificar o padrão de glicosilação, levando a alterações nas características antigênicas, gerando vantagem evolutiva ao vírus (CUI et al., 2013). Os dois grupos do HRSV possuem taxas evolutivas semelhantes e exibem graus comparáveis de conservação. Em ambos, o gene G é excepcionalmente variável e apresenta taxas de substituição elevadas em comparação com outros genes (TAN et al., 2013).

Esse dinamismo na variação genética do HRSV permite sua evasão da resposta imune pré-existente do hospedeiro, ocasionando as reinfecções, consequentemente, os surtos periódicos (PRETORIUS et al., 2013). Vários genótipos podem cocircular numa mesma comunidade e estar relacionados aos diferentes graus da severidade da infecção (DE-PARIS et al., 2014).

1.3 QUADRO CLÍNICO DA INFECÇÃO

O HRSV é considerado um fator de alto risco para humanos, especialmente para recém-nascidos e adultos vulneráveis (NAIR et al., 2010). A gravidade varia de doença leve do trato respiratório superior à doença grave do trato respiratório inferior (CANE, 2007). É o patógeno mais encontrado em isolados virais de pacientes hospitalizados com bronquiolite ou pneumonia (COLLINS; POLLARD, 2002). Sendo desta forma, um grande problema para a saúde pública (PRENDERGAST; PAPENBURG, 2013).

A transmissão ocorre principalmente pela disseminação de perdigotas ou pelo contato direto (SALTER; LAOI; CROWLEY, 2011). A inoculação ocorre através do nariz, resultando em replicação viral na nasofaringe por um período de incubação de quatro a cinco dias. Em crianças pequenas e imunocomprometidos a replicação viral é mais prolongada, e assim, o vírus pode se abrigar por até vinte e um dias (COLLINS; POLLARD, 2002).

É comum o indivíduo afetado apresentar rinorréia, tosse e febre baixa, assim como sinais de infecção das vias aéreas inferiores, tais como, aprisionamento de ar e respiração ofegante (COLLINS; GRAHAM, 2008), podendo evoluir para a síndrome respiratória aguda (LIMA et al., 2012).

O epitélio respiratório é o alvo principal do HRSV (WU et al., 2012), infectando células ciliadas dos bronquíolos e pneumócitos nos alvéolos (COLLINS; GRAHAM, 2008). A replicação viral fica restrita às células epiteliais do trato respiratório superior e inferior, pois ainda não foi observada a disseminação deste vírus para outros órgãos, mesmo em pacientes imunocomprometidos (BRANIGAN et al., 2005).

Os danos celulares causados pela infecção viral são caracterizados pela resposta inflamatória extensa (WU et al., 2012), provavelmente, envolvendo a

produção de citocinas e quimiocinas pelas células afetadas e no recrutamento de células do sistema imunológico para dentro dos pulmões. Esse fato causa um infiltrado celular no pulmão, podendo mediar uma lesão imunológica, agravando a patogenicidade desta doença (VAN BLEEK et al., 2003). Podem ainda ocorrer sinais abundantes de obstrução das vias aéreas devido à descamação de células epiteliais e secreção de muco (COLLINS; GRAHAM, 2008).

Crianças infectadas apresentam respostas imunes reduzidas devido à imunossupressão dos anticorpos séricos anti-HRSV maternos, assim como, pela imaturidade imunológica (COLLINS; GRAHAM, 2008). Porém, mesmo que o organismo da pessoa infectada pelo HRSV tenha desenvolvido altos títulos de anticorpos neutralizantes, as reinfecções podem ocorrer. A resposta de células T contra o HRSV é crucial para a erradicação eficiente do vírus a partir do pulmão infectado, entretanto, a intensidade da resposta imune durante as infecções primárias e secundárias podem determinar a gravidade desta doença (VAN BLEEK et al., 2003).

Infecções mais graves causadas pelo HRSV estão correlacionadas com nascimento prematuro, doença pulmonar crônica da prematuridade, cardiopatia congênita e imunodeficiência de células T. O desenvolvimento incompleto ou danos às vias áreas e / ou hiper-reatividade das vias aéreas de recém-nascidos prematuros contribuem para a morbidade ocasionada por este vírus. Imunodeficiência, imunossupressão ou idade avançada também podem levar a replicação viral prolongada e doença mais grave. E ainda, recém-nascidos prematuros com baixo peso oudo sexo masculino, ou de nascimentos múltiplos, também estão relacionados aos fatores de riscos. Nos casos menos grave, quando não devidamente tratada, esta infecção pode causar asma e otite média ao longo da infância (HURK; WATKISS, 2012).

Estes fatos, aliados à grande incidência desta infecção, levam a altos custos com hospitalizações e medicamentos desnecessários (DALL'AGNOLA; GIRARDI; BEGHINI, 2013). Esta situação mostra a extrema necessidade no desenvolvimento de vacinas, medidas preventivas e diagnóstico de qualidade (VAN REMMERDEN et al., 2012). Testes laboratoriais das secreções respiratórias são necessários para a confirmação da infecção pelo HRSV, pois sua sazonalidade e manifestações clínicas inespecíficas podem sobrepor-se com IRAs causadas por outros vírus ou bactérias (CHARTRAND; TREMBLAY; RENAUD, 2015).

1.4 PREVENÇÃO, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

As abordagens empregadas no desenvolvimento de vacinas contra o HRSV incluem inativação do vírus por formalina (FI-RSV) ou por outros métodos, HRSV atenuado vivo, subunidades proteicas e vacinas de DNA. Porém, nenhum destes métodos foi aprovado até o momento para utilização em seres humanos (MCLELLAN, 2015; SINGH et al., 2007).

O tratamento das infecções pelo HRSV inclui cuidados primários de suporte, como oxigenação, hidratação (via oral ou intravenosa), limpeza da obstrução nasal, sucção nasal do bulbo ou aspiração profunda. Em alguns casos, é necessário ventilação mecânica, uso de broncodilatadores ou da Ribavirina, um antiviral que inibe a replicação viral. Porém, este medicamento possui eficácia limitada para o HRSV (EILAND, 2009; POLACK, 2015). Como não há vacina aprovada disponível, nem tratamento farmacêutico específico (MAZUR et al., 2015; MEJIAS; RAMILO, 2015), desde 1998, vem sendo utilizado, para profilaxia, o anticorpo monoclonal (mAb) humanizado Palivizumabe (MEDI-493, *Synagis*, *MedImmune, Inc., Gaithersburg, MD*) (Abbott Laboratórios do Brasil Ltda), gerado contra a proteína F do HRSV. Porém, o alto custo e a necessidade de administração recorrente dificultam seu uso (POLACK, 2015), restringindo apenas às crianças com risco de desenvolver a forma grave da doença (EILAND, 2009; RODRIGUEZ; RAMILO, 2014). O Motavizumabe (MEDI-524, *Numax*) (anticorpo derivado do Palivizumabe) foi desenvolvido com modificações no sítio de interação com o antígeno, de modo a ter elevada afinidade pelo alvo, consequentemente, melhor eficácia que o Palivizumabe. Entretanto, foi desaprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (E.U.A) por causar hipersensibilidade e urticária nos pacientes (BAWAGE et al., 2013).

Devido a sua natureza altamente contagiosa e falta de tratamento específico, o HRSV requer um diagnóstico rápido e preciso, tão logo que os primeiros sintomas apareçam, a fim de que sejam tomadas as medidas necessárias de contenção do vírus e direcionamento ao tratamento mais adequado (ESPOSITO et al., 2016b; POPOW-KRAUPP; ABERLE, 2011). Esta forma de diagnóstico pode ser realizada através da detecção do vírus, proteínas ou genoma viral, presentes nas secreções nasofaríngeais de pacientes com sintomas de IRA (COLLINS; POLLARD, 2002). Atualmente existem quatro principais categorias de diagnósticos comerciais para o

HRSV, sendo: cultura viral (detecção do vírus), reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (detecção do RNA viral), imunofluorescência (IF) (detecção do vírus ou proteínas virais) e os imunoenaios (detecção das proteínas virais) (CHARTRAND; TREMBLAY; RENAUD, 2015). A TABELA 1 mostra alguns destes testes disponíveis comercialmente.

TABELA 1 – DIFERENTES TESTES DE DIAGNÓSTICOS COMERCIAIS PARA O HRSV E SEUS RESPECTIVOS FORNECEDORES

(Continua)

Método	Teste	Fornecedor	Referência
Molecular (<i>multiplex</i>)	xTAG Respiratory Viral Panel	Luminex Molecular Diagnostics	Salez et al. (2015).
	Film Array respiratory viral panel assay	BioFire Diagnostics	
	Fast Track Diagnostics Respiratory Pathogen	Fast Track Diagnostics	
	CLART PneumoVir	Genomica	
	RespiFinder	Pathofinder	
	eSensor Respiratory Viral Panel	GenMarkDx	
	MultiCode-PLx	EraGen Biosciences	
	Easyplex respiratory pathogen	Ausdiagnostics	
	Seeplex RV15 OneStep ACE Detection	Seegene Inc.	
	Pneumobacter ACE Detection	Seegene Inc.	
ELISA	Magicplex RV Panel Real-time Test	Seegene Inc.	O autor (2017)
	eResPlex II Panel	Qiagen	
	Human Anti-Respiratory syncytial virus IgG ELISA Kit (RSV)	Abcam	
	MaxDiscovery™ Respiratory Syncytial Virus (RSV) ELISA Kit	Bioo Scientific	
	Respiratory syncytial virus elisa	VirCell	
	Respiratory Syncytial Virus IgM/IgG ELISA	ALPCO	
	Respiratory syncytial virus (RSV) IgA/IgM/IgG ELISA	IBL	
	Serion ELISA classic: Respiratory Syncytial Virus IgA/IgG/ IgM	Serion	
	Human Anti-Respiratory syncytial virus F protein (RSV-F) IgA ELISA	Alpha Diagnostic	
	Mouse Anti-Respiratory syncytial virus (RSV) antibody (IgG) ELISA Kit (Sandwich ELISA)	Life Span BioSciences	

Método	Teste	Fornecedor	Referência
Teste rápido	Abbott Test Pack RSV	Abbott Laboratories	Chartrand et al. 2015
	Directigen RSV	Becton Dickinson	
	Directigen EZ RSV	Becton Dickinson	
	Binax NOW RSV	Binax, Inverness Medical	
	BD Veritor RSV	Becton Dickinson	
	Sofia RSV _{FIA}	Quidel Corporation	

Os testes moleculares (RT-PCR e PCR em tempo real, qRT-PCR), por serem altamente sensíveis e específicos (ESPOSITO et al., 2016b; INAGAKI et al., 2016; POPOW-KRAUPP; ABERLE, 2011), se tornaram referência de diagnóstico para as infecções respiratórias agudas (CHARTRAND; TREMBLAY; RENAUD, 2015; INAGAKI et al., 2016; JONCKHEERE et al., 2015), melhorando significativamente a identificação dos agentes etiológicos causadores destas infecções (ESPOSITO et al., 2016b).

Uma grande variedade de testes moleculares *multiplex* tem sido desenvolvida nos últimos anos. Estes testes possuem capacidade para amplificar e detectar um painel de vários vírus respiratórios, simultaneamente, numa mesma amostra, de forma rápida e prática, através de microarranjos em suspensão (SALEZ et al., 2015).

Os imunoensaios estão entre os métodos mais promissores para diagnóstico de qualidade e de baixo custo (AKHTER; JOHANI, 2011; BAWAGE et al., 2013; COLLINS; POLLARD, 2002; GRANDIN et al., 2015; JONCKHEERE et al., 2015). Estes ensaios exploram a especificidade da interação antígeno-anticorpo para detectar e identificar o patógeno causador de uma determinada infecção. Através destes ensaios é possível detectar tanto a presença de antígenos (infecção recente), quanto dos anticorpos gerados durante a infecção (infecção tardia) (ensaios sorológicos) (ZHANG et al., 2014). Entretanto, devido à gravidade da infecção aguda para crianças pequenas e adultos vulneráveis, os ensaios sorológicos para o HRSV são aplicados somente em estudos epidemiológicos (AGRAWAL et al., 2005; POPOW-KRAUPP; ABERLE, 2011). Os testes de imunoensaios mais empregados

no diagnóstico do HRSV são o ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e os testes de detecção rápida de antígenos (RADTs) (LIMA et al., 2012).

Os RADTs (*point of care*), também conhecidos como fluxo lateral, foram rapidamente aceitos por sua facilidade de uso e rapidez. Os resultados ficam disponíveis em torno de 30 minutos no ponto de atendimento, sem a necessidade de pessoal treinado e estrutura laboratorial (PRENDERGAST; PAPENBURG, 2013). Trata-se de um método imunocromatográfico, em que anticorpos específicos são imobilizados em membranas adequadas, que ao entrar em contato com as partículas virais, presentes na amostra clínica, reagem, revelando uma alteração macroscópica da cor, indicando a infecção ativa (CHARTRAND; TREMBLAY; RENAUD, 2015). Apesar da grande variedade de testes disponíveis, o diagnóstico do HRSV ainda permanece ineficiente e problemático (BRENDISH; SCHIFF; CLARK, 2015; HALL, 2001; KOO et al., 2017).

1.5 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS NO DIAGNOSTICO DO HRSV

Embora o isolamento viral em cultura celular seja altamente sensível e específico em lactentes, e até recentemente tenha sido o padrão-ouro, seu uso é limitado por problemas práticos. O HRSV é um vírus extremamente instável e muitas vezes não sobrevive ao transporte e cultura, além disso, se multiplica lentamente, podendo levar mais de cinco dias, limitando desta forma, o uso deste método como ferramenta de diagnóstico desta infecção (COLLINS; POLLARD, 2002).

Apesar do PCR ter se tornado o método de referência para o diagnóstico de infecções virais, devido à sua alta sensibilidade e especificidade, é uma técnica relativamente cara e requer conhecimento técnico e estrutura laboratorial adequada, que nem sempre estão disponíveis (ESPOSITO et al., 2016a; GINOCCHIO; MCADAM, 2011; JONCKHEERE et al., 2015; POPOW-KRAUPP; ABERLE, 2011).

Alternativamente, os RADTs vêm sendo uma boa opção em relação a custo-benefício (BRUNING et al., 2014; LEONARDI et al., 2015; PEELING; OLLIARO, 2016). Porém, como nos demais imunoenaios de infecções respiratórias, possuem sensibilidade e especificidade baixa em relação aos métodos moleculares e de cultivo (JONCKHEERE et al., 2015). Estas limitações dos imunoenaios estão diretamente relacionadas às características e qualidades das moléculas que os compõem (antígeno ou anticorpo), assim como, da amostra clínica analisada

(SOUZA et al., 2017). Estes fatos mostram a extrema importância no desenvolvimento e otimização destas moléculas de modo a suprir o mercado nacional com matéria prima de qualidade, possibilitando a produção de testes imunológicos eficazes para o HRSV, inclusive os RADTs.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Obter antígenos do vírus sincicial respiratório humano e anticorpos contra este vírus e avaliar o potencial destas moléculas para detectar a infecção ativa pelo HRSV nas amostras clínicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir vetores para expressão das proteínas mais imunogênicas do HRSV, em *Escherichia coli*;
- Padronizar a expressão e purificação de cada uma destas proteínas;
- Obter anticorpos policlonais contra os antígenos N, F1 e G recombinantes do HRSV;
- Construir vetores para expressão dos fragmentos Fabs dos anticorpos monoclonais Palivizumabe e Motavizumabe, em *Pichia pastoris*;
- Avaliar a interação dos fragmentos Fabs com os seus respectivos antígenos recombinantes ou com os antígenos nativos das amostras nasofaringeais;
- Conjugar os anticorpos com a enzima peroxidase para realização de ensaios imunológicos diretos;
- Realizar análises *in silico* das características genéticas do HRSV;
- Avaliar a sensibilidade e especificidade dos anticorpos monoclonais e policlonais frente ao painel de amostras clínicas previamente caracterizadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os avanços da biologia molecular e da genética, a partir de 1970, levaram ao desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, que teve um grande impacto na pesquisa científica, assim como no diagnóstico e no tratamento de doenças. Os testes de diagnósticos requerem grande quantidade de antígenos ou anticorpos com alto grau de pureza, produção constante e identidade consistente entre um lote e outro (OIE, 2009). A engenharia genética permitiu a produção de proteínas homólogas de forma controlada e eficiente, além disso, possibilitou a utilização de várias proteínas indisponíveis através da forma nativa. Além disso, esta ferramenta permitiu realizar modificações nas sequências gênicas das proteínas de interesse, a fim de otimizar seu desempenho de acordo com suas aplicações. Consequentemente, este tipo de proteína tem se tornado molécula chave para os ensaios diagnósticos (WARNES; FOOKS; STEPHENSON, 2004), incluindo o desenvolvimento de anticorpos monoclonais. Com este propósito, as sequências gênicas das três proteínas mais imunogênicas do HRSV (N, F e G) e do fragmento Fab (Fragmento de ligação ao antígeno), proveniente dos anticorpos comerciais Palivizumabe e Motavizumabe, foram inseridas em vetores de expressão para obtenção de moléculas sintéticas (recombinantes), de acordo como descrito nos itens 3.1 e 3.2

3.1 EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES

3.1.1 Obtenção das sequências gênicas e subclonagem

Para delineamento das construções sintéticas, além das sequências descritas em artigos científicos para a expressão das proteínas do HRSV em sistemas heterólogos (F1, ARCURI et al., 2008; G, MURBY et al., 1995; N, BURAPHACHEEP et al., 1997), foram utilizadas também, sequências de aminoácidos depositadas no Genbank/NCBI. As sequências de nucleotídeos foram otimizadas de modo a possibilitar a expressão em *E. coli* e foram sintetizadas pela empresa *GenScript* (Piscataway, NJ, EUA) no vetor de clonagem pUC57.

Informações detalhadas de cada clone com seus respectivos códigos estão apresentadas na TABELA 2.

TABELA 2 – PROTEÍNAS DO HRSV SELECIONADAS PARA OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES

Código	Antígenos	ID	Inserto (pb)	AA	PM (kDa)
IBMP 10-1	Fusão 1 (F1)	P12568.1	1347	137-574	47
IBMP 10-2	Fusão 2 (F2)	P12568.1	384	21-136	13
IBMP 10-3	* Fusão 1 (F ₄₁₂)	P12568.1	375	412-524	12
IBMP 10-4	Glicoproteína (G)	P27022	729	67-297	25
IBMP 10-5	Nucleocapsídeo (N)	AAC14896	1206	1-391	43

FONTE: O autor (2017).

NOTA: *A proteína de código 10-3 é um fragmento da proteína de código 10-1, que contém várias regiões imunogênicas (SINGH *et al.*, 2007). Fusão 1 e Fusão 2 se referem as subunidades 1 e 2 da proteína de fusão.

Após a síntese, aproximadamente 100 ng de cada vetor foram usados para transformar 50 µL da cepa *DH5α* de *E. coli* (cepa específica para amplificação de DNA plasmidial) cálcio-competente através de choque térmico (incubação das células bacterianas com o DNA plasmidial por 30 minutos no gelo, 2 minutos a 42°C, 2 minutos no gelo novamente e recuperação das células com 950 µL de meio LB (*Lysogeny Broth* - BERTANI, 2004) (1% triptona, 0.5 % extrato de levedura, 1% NaCl - SAMBROOK; RUSSEL, 2000) com agitação constante de 200 rpm por 1 hora, 37°C). Uma pequena alíquota deste cultivo (50-150 µL) foi utilizada para obter as células transformantes em meio LB sólido (1% triptona, 0.5 % extrato de levedura, 1% NaCl, 1,5% ágar – SAMBROOK; RUSSEL, 2000) suplementada com o antibiótico seletivo adequado (100 µg/mL de ampicilina).

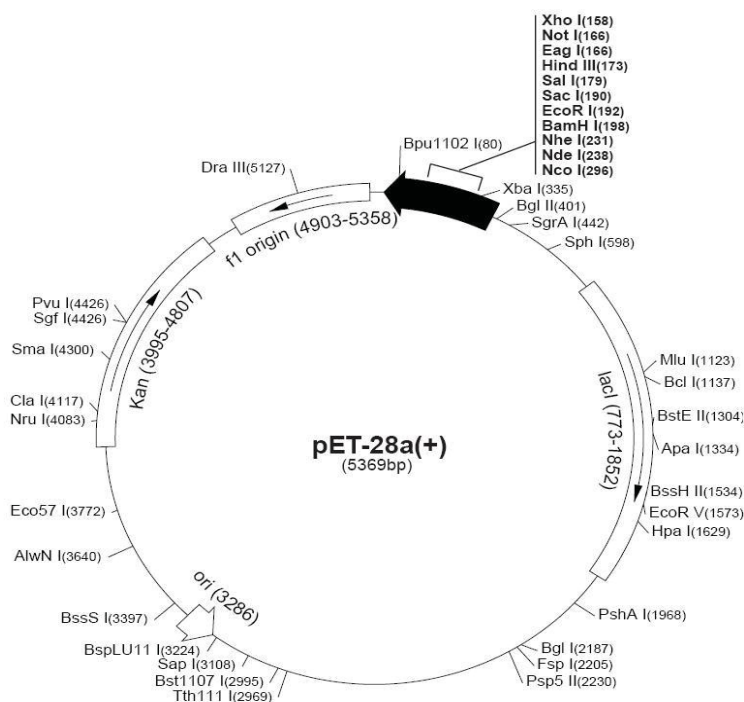
Para amplificação dos vetores, uma colônia isolada foi crescida em meio LB líquido, suplementado com ampicilina (100 µg/mL) por aproximadamente 16 horas a 37°C, sob agitação constante de 200 rpm. Após a coleta das células por centrifugação (5.000 xg, 10 minutos, 4°C), o DNA plasmidial, contendo as

sequências gênicas de interesse, foi purificado através do kit da QIAGEN [QIAprep® *Spin Miniprep Kit* (250), n. 25106] e utilizado na subclonagem.

De forma geral os genes são obtidos em vetor de clonagem e devem ser subclonados no vetor de expressão adequado ao sistema a ser adotado. Neste caso, todas as sequências gênicas dos antígenos do HRSV foram subclonadas em vetor de expressão bacteriano. Estas sequências foram planejadas de forma a conterem os sítios de restrição necessários para as subclonagens posteriores.

O vetor de expressão escolhido foi o pET28a (Novagen) (FIGURA 7), no qual a sequência codificadora da proteína de interesse é clonada sob o controle do promotor da *RNA polimerase do fago T7*. Além disso, a sequência da proteína é clonada em fusão com seis histidinas (6xHis) na extremidade N-terminal, o que facilita sua purificação por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC).

FIGURA 7 – MAPA DO VETOR PARA A EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES DO HRSV



A seta maior indica a localização dos sítios de restrição, local onde é inserido a sequência gênica de interesse. Kan (Canamicina) é o gene que confere resistência a este plasmídeo. FONTE: NOVAGEN, (2003).

Para isolar o inserto do vetor pUC57, 5 µg de DNA de cada antígeno foram simultaneamente clivados com 15 unidades de cada enzima de restrição (*BamHI* e

HindIII, ambas da empresa Fermentas) a 37°C por duas horas, aplicados em gel de agarose 1,2% e extraídos do gel através do kit de extração da Qiagen [*QIAquick® Gel Extration Kit* (250), n. 28706].

A ligação do inserto purificado com o vetor de expressão se deu na proporção 3:1 (inserto:vetor), utilizando 100 ng do vetor linearizado, com as mesmas enzimas e condições aplicadas aos insertos, e incubação com 5 unidades da enzima *T4 DNA ligase* (Invitrogen) no volume final de 10 µL por reação, por 2 horas a 22°C. O volume total de cada reação foi utilizado para transformar uma alíquota de 100 µL da *E. coli DH5α* cálcio-competente em suspensão, através de choque térmico.

A confirmação dos clones, no vetor de expressão contendo o inserto de interesse, foram obtidos através da análise de DNA plasmidial de 6 colônias diferentes para cada antígeno, sendo os plasmídios extraídos das células bacterianas por lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2000), clivados com as mesmas enzimas de restrições utilizadas na subclonagem e aplicados em gel de agarose (1,2%), o qual foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/L) para confirmar o tamanho do inserto.

Uma das colônias contendo o inserto com o tamanho esperado foi utilizada para transformar a cepa de *E. coli DH5α* cálcio-competente para amplificação dos clones contendo os insertos de interesse. Para isso, as bactérias cresceram em meio LB líquido suplementado com 50 µg/mL de canamicina (antibiótico adequado ao vetor de expressão pET28a) a 37°C com rotação constante de 200 rpm por um período de aproximadamente 16 horas. Os plasmídios foram purificados através do kit *MidiPrep Plasmid Purification* (Qiagen).

Para confirmar a sequência do clone, uma alíquota contendo 1 µg de cada clone foi sequenciada (*Macrogen Inc.*, Coréia) e alíquotas contendo 100 ng deste material foram utilizadas para transformar cepas de *E. coli* específicas para expressão de proteínas recombinantes, item 3.1.2.

3.1.2 Ensaio para padronização da expressão em sistema bacteriano

A expressão dos antígenos recombinantes do vírus HRSV foi realizada na cepa *BL21(DE3)-Star* (Invitrogen) da bactéria *E. coli*, cuja transformação se deu através de choque térmico. As bactérias transformadas foram selecionadas através

de seu crescimento em meio LB sólido suplementado com o antibiótico canamicina (50 µg/mL), cujo gene de resistência está inserido no vetor de expressão (FIGURA 7).

Para os testes de indução da expressão, uma colônia isolada e fresca da bactéria transformada foi escolhida aleatoriamente e pré-inoculada em 5 mL de meio LB suplementado com canamicina (50 µg/mL) sob agitação constante a 37°C por 16 horas. Este volume foi inoculado em 100 mL de meio LB contendo canamicina (50 µg/mL) e incubado a 37°C sob agitação constante até alcançar a densidade óptica (DO₆₀₀) entre 0,6-0,8, o que corresponde ao período de aproximadamente 2 horas. Após este período, de crescimento celular bacteriano, foi adicionado o indutor IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) para a concentração final de 0,5 mM.

A fim de testar as melhores condições de expressão para cada antígeno, logo após a adição do IPTG, os inóculos foram submetidos às temperaturas de 25, 30 e 37°C por 4 horas, e a 15°C por aproximadamente 16 horas. Foi realizado em paralelo o controle positivo de indução (utilizando a proteína L fusionada a GFP) e o controle negativo (indução de células não transformadas com o vetor, submetidas às mesmas condições das demais).

Com base nos resultados destes ensaios, visando padronizar a expressão e purificação dos antígenos recombinantes do HRSV, foram realizadas as induções em maior escala (2 L de meio LB) de acordo com a melhor condição de expressão para cada antígeno. Para isso, as colônias foram pré-inoculadas em 100 mL LB suplementado com canamicina (50 µg/mL) e crescidas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após o período de indução, em ambos os casos, as células foram coletadas por centrifugação (6.000 xg, 10 minutos, 4°C) e estocadas a -20°C até o preparo do extrato, conforme o item 3.1.3.

3.1.3 Preparo dos extratos

Após o descongelamento, as células provenientes das induções foram ressuspensas em 2 mL/g de células no tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, 5% glicerol, 1 mM PMSF); apesar de ser uma composição padrão, em alguns casos, foi necessário variar o pH, inserir ou

aumentar/diminuir a concentração de alguns aditivos nos tampões, ajustando-os de acordo com as características físico-químicas de cada proteína (TABELA 3).

As células provenientes dos testes de indução sofreram lise enzimática por lisozima (200 µg/mL) com incubação no gelo por 60 minutos seguido de sonicação (*Ultrasonic processor: Cole-Parmer, Vernon Hills, USA*) (5 ciclos de 5 segundos com intervalo de 30 segundos, no gelo; amplitude 40%). O extrato total foi clarificado por centrifugação (centrífuga *Eppendorf, 5417R*) (20.000 xg, 20 minutos, 4°C); o sobrenadante (fração solúvel) foi imediatamente acondicionado em gelo, já o precipitado (fração insolúvel), foi ressuscitado em 1 mL do tampão de lise acrescido de 2% de Triton X-100 e novamente submetido às mesmas condições anteriores. O sobrenadante desta etapa foi descartado, e o precipitado (corpos de inclusão) ressuscitados em 500 µL do tampão de lise ou submetidos aos testes de solubilização (item 3.1.4), no caso de proteínas obtidas na forma insolúvel. Alíquotas de 100 µL das frações solúveis e insolúveis foram armazenadas a -20°C para análises posteriores, conforme descrito no item 3.3.

TABELA 3 – PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS ANTÍGENOS DO HRSV

Clone	Ag	PM (kDa)	pl	CoefEx	Inst index	Cisteínas	% aa hidrof.
IBMP 10-1	RSV-F1	51	8.7	31860	36.2	13	52
IBMP 10-2	RSV-F2	17	10.1	12950	50.6	02	35
IBMP 10-3	Frag. RSV-F	16	9.0	8940	29.1	03	40
IBMP 10-4	RSV-G	29	10.0	8480	41.5	04	32
IBMP 10-5	RSV-N	47	7.8	29340	36.7	03	49

Dados obtidos no ExpasyProt Param.

CoefEx) Coeficiente de extinção. Inst index) Índice de estabilidade.

Já para os ensaios de padronização da purificação, para os cultivos com 2 litros de cultura, a lise celular foi através de pressão no equipamento microfluidificador (modelo M-110L, da *Microfluidics*) (5 ciclos com pressão de 80 psi). A remoção de ácidos nucleicos se deu por sonicação (5 ciclos de 10 segundos com amplitude 40%) e sulfato de estreptomicina (1% p/v) (15 minutos no gelo sob agitação branda). O extrato foi clarificado por centrifugação (25.000 xg, 30 minutos, 4°C) e o sobrenadante resultante foi recuperado, filtrado em membrana de poro 0,45

µm e imediatamente utilizado no processo cromatográfico, conforme detalhado no item 3.3.2.

3.1.4 Solubilização dos corpos de inclusão

A fim de recuperar as proteínas de interesse dos corpos de inclusão de *E. coli*, foram testados dois protocolos de solubilização. Na primeira tentativa, os corpos de inclusão foram solubilizados com 8 M de ureia, sob agitação constante por aproximadamente 16 horas em temperatura ambiente. No segundo momento, foi padronizado um protocolo com utilização de baixas concentrações de agentes caotrópicos (adaptado de ARCURI *et al.*, 2008) (ANEXO 1). Neste protocolo, os corpos de inclusão provenientes de 25 mL de cultura (~200 mg) foram ressuspendidos em 1 mL do tampão de solubilização CAPS (50 mM CAPS, pH 10,0, 1% *N-lauroylsarcosine*, 5 mM EDTA, 10 mM DTT) e mantidos sob agitação branda por 24 horas em temperatura ambiente. A recuperação das proteínas solubilizadas foi através de centrifugação (20.000 xg, 20 minutos, 15°C); uma alíquota do sobrenadante foi aplicada em gel de poliacrilamida e o restante utilizado nos testes de purificação, como descrito no item 3.3.

3.2 EXPRESSÃO DOS ANTICORPOS RECOMBINANTES

Pelo fato de que os anticorpos obrigatoriamente devem possuir enovelamento e dimerização adequados, suas construções foram feitas para expressão em sistema eucarioto.

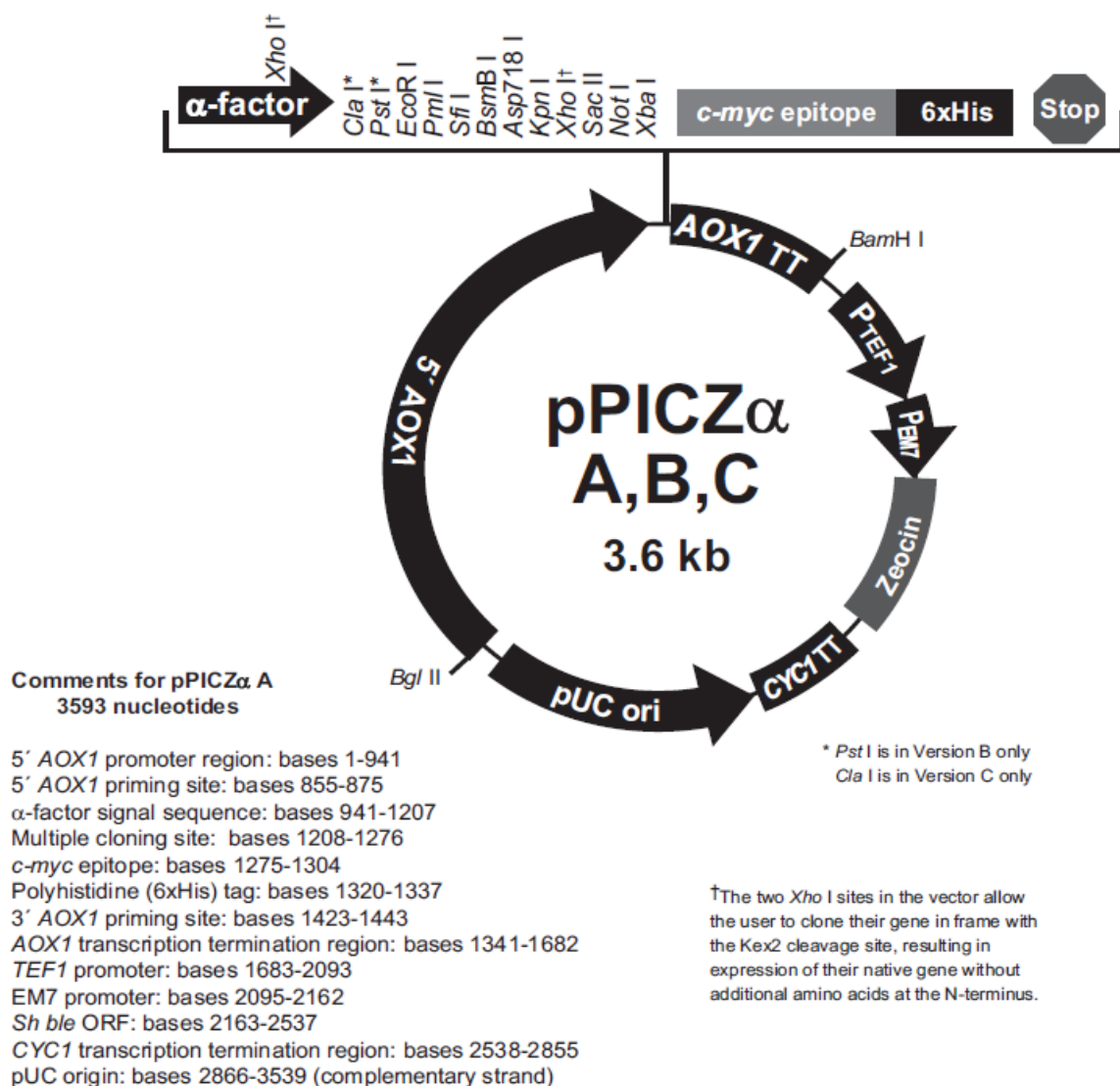
3.2.1 Construção dos vetores para expressão do fragmento Fab

As sequências codificantes dos fragmentos Fabs foram obtidas por PCR, utilizando como *templates* os genes sintéticos do Palivizumabe e do Motavizumabe no vetor pUC57 (*Gen Script: Piscataway, NJ, EUA*) com os oligonucleotídeos iniciadores da TABELA 4. A sequência de aminoácidos do anticorpo Palivizumabe se tornou disponível a partir de agosto/2015 devido a expiração de sua patente

(CA2197684) e o Motavizumabe não foi aprovado pelo FDA. Os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados no Instituto de Biologia Molecular do Paraná.

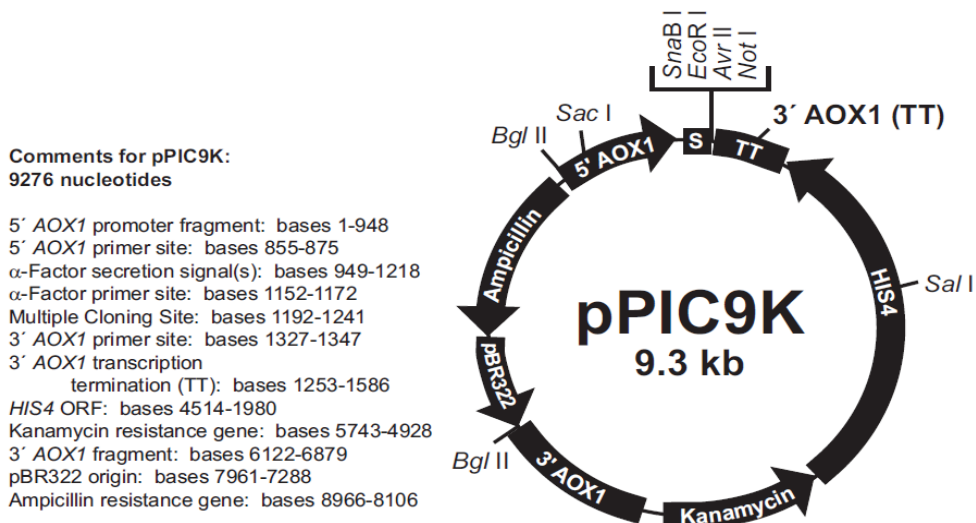
Os vetores foram construídos para expressão em *P. pastoris*, de modo que a sequência codificadora do fragmento da cadeia leve (CL) foi inserida no vetor de expressão pPICZ α (Invitrogen) (FIGURA 8), entre os sítios de restrição *EcoRI* e *XbaI*; já a sequência codificadora do fragmento da cadeia pesada (CH) foi inserida no vetor pPIC9K (Invitrogen) (FIGURA 9), entre os sítios *EcoRI* e *NotI*.

FIGURA 8 – MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO UTILIZADO NA PRODUÇÃO DAS CADEIAS LEVES DO FRAGMENTO Fab RECOMBINANTE



O esquema mostra o peptídeo sinal de secreção, a localização dos sítios de restrição, local onde é inserido a sequência gênica de interesse e as etiquetas fusionadas na proteína heteróloga (epítipo c-myc e 6xhis) e por último o códon de parada da tradução. Zeocin é o gene que confere resistência a este plasmídeo. FONTE: INVITROGEN (2010).

FIGURA 9 – MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO UTILIZADO NA PRODUÇÃO DAS CADEIAS PESADAS DO FRAGMENTO Fab RECOMBINANTE



O esquema mostra a localização dos sítios de restrições, local onde é inserido a sequência gênica de interesse. *SacI* é o local onde o vetor é linearizado para inserção no genoma da levedura. Ampicilina se refere ao gene que dá resistência ao antibiótico ampicilina em *E. coli* e à geneticina em *P. pastoris*. FONTE: INVITROGEN (2010).

TABELA 4 – SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS Fab DO PALIVIZUMABE E MOTAVIZUMABE

Primer	Sequência
Fab LF	5' ataataGAATTCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCACC 3'
Fab LR	5' ataataTCTAGACCTCCAGAACCACCACCAGAGCCGCCGCCAGC 3'
Fab HF	5' ataataGAATTCAGGTCACCTTGAGGGAGTCTGGTCCTGC 3'
Fab HR	5'ataataGCGGCCGCTTACTTGTCTCATCGTCTTTGTAGTCTGTGTGAGTTTGTACATGATT TGGGCTC3'

* L e H se referem à cadeia leve e pesada; F e R se referem ao *forward* e *reverse*. Os nucleotídeos sublinhados referem-se aos sítios das enzimas de restrição utilizadas para subclonagem nos vetores de expressão. Os nucleotídeos em letras minúsculas se referem aos nucleotídeos adicionados aleatoriamente para ancoragem das enzimas de restrição.

Os parâmetros para a PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 30 ciclos (45s a 95°C, 30s a 62°C, 60s a 68°C), seguido de 5 minutos a 70°C no termociclador ProFlex (*Life Technologies*). Cada reação foi composta de 25 pmol de cada oligonucleotídeo, 2 unidades da Taq DNA polimerase (*Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity – Invitrogen*), tampão da Taq polimerase (1x) (*High Fidelity PCR Buffer 10x – Invitrogen*), 50 mM de MgSO₄, 10 mM dNTP, 20 ng do template, em volume final de 50 μ L por reação com H₂Oqsp. Os produtos de PCR foram

purificados através de gel de agarose (0,8%) e do kit de extração da Qiagen [*QIAquick® Gel Extraction Kit* (250), n. 28706].

Para inserção nos seus respectivos vetores de expressão, o DNA amplificado referente ao FabL foi clivado com as enzimas de restrição *EcoRI* (Thermo Scientific) e *XbaI* (Invitrogen); os amplicons da FabH foram clivados com as enzimas de restrição *EcoRI* (Thermo Scientific) e *NotI* (BioLabs), a 37 °C por aproximadamente 16 horas. Foram utilizadas 15 unidades de cada enzima para 5 µg de DNA para o volume final de 50 µL por reação. Paralelamente, os vetores pPICZα e pPIC9K circulares, foram clivados, respectivamente, com as mesmas enzimas e condições. Tanto os insertos quanto os vetores linearizados foram precipitados com etanol absoluto (Merck Millipore) e então utilizados na reação de ligação, na proporção 3:1 (inserto: vetor); sendo utilizados 100 ng de vetor e 5 unidades da T4 DNA ligase (Invitrogen) num volume final de 10 µL para cada reação, a 16 °C por aproximadamente 20 horas.

O volume total de cada reação foi utilizado para transformar uma alíquota de 100 µL de *DH5α* (cepa de *E. coli* utilizada para amplificação de DNA plasmideal) cálcio competentes por choque térmico. Após o plaqueamento do volume total de células em meio sólido seletivo adequado (100 µg/mL de zeocina para o pPICZ e 100 µg/mL de ampicilina para o pPIC9K), os clones positivos foram selecionados pelo *screening* de 5-10 colônias isoladas e aleatórias, através da lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2000), seguida da clivagem do DNA plasmidial com as mesmas enzimas de restrição e condições utilizadas na subclonagem; estes DNAs foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio (0.5 µg/L).

Uma colônia contendo o inserto com o tamanho esperado (clone positivo) de cada clone foi cultivada em meio LB líquido com os respectivos antibióticos para amplificação destes DNAs. Os plasmídeos resultantes foram purificados através do kit *Midi Prep Plasmid Purification* (Qiagen). Para confirmar a integridade da sequência do DNA subclonado, alíquotas contendo 1 µg do DNA dos clones positivos foram enviadas para o sequenciamento (Macrogen Inc., Coréia) e o restante deste material foi utilizado para transformar *P. pastoris*, conforme descrito no item 3.2.2.

3.2.2 Transformação de *P. pastoris* e seleção da inserção de múltiplas cópias

A expressão dos fragmentos Fabs foi realizada em sistema de levedura metiltrófica *P. pastoris*, que possui dois genes que codificam a álcool oxidase (AOX1 e AOX2), possibilitando a indução das proteínas recombinantes com metanol. Foram testadas paralelamente duas cepas, a *GS115* (Invitrogen) e *KM71* (Invitrogen), que geram transformantes com fenótipos Mut⁺ (*Methanol utilization plus*) e/ou Mut^s (*Methanol utilization slow* - ou Mut⁻).

O fenótipo Mut⁺ por possuir os genes AOX1 e AOX2, possibilita as células metabolizar grande quantidade de metanol rapidamente; já o fenótipo Mut^s, por possuir mutação no gene AOX1, reduz a capacidade das células em metabolizar o metanol, fazendo que a indução ocorra lentamente. Cepas *GS115* transformadas com vetores linearizados com a enzima de restrição *SacI* terão a maior parte dos fenótipos Mut⁺. Vetores linearizados com *BglII* vão gerar a maioria dos transformantes com fenótipo Mut^s. A cepa *KM71* é capaz de gerar apenas o fenótipo Mut^s.

Para o controle positivo da indução foi utilizada a cepa *GS115* transformada com albumina humana secretada (HSA) (Invitrogen), de forma a gerar o fenótipo Mut^s; os controles negativos foram as cepas não transformadas, crescidas nas mesmas condições que as demais.

Para a transformação de *P. pastoris*, 15 µg do DNA de cada gene foram linearizados com 45 unidades da enzima de restrição *SacI* (BioLabs) a 37°C por aproximadamente 16 horas. Os DNAs linearizados foram precipitados com etanol absoluto e ressuspensos em H₂O_{qsp} para uma concentração de 1µg/µL e então, utilizados na transformação.

A fim de que as cadeias leves e pesadas do Fab fossem corretamente enoveladas ao longo da expressão em *P. pastoris*, foi realizado co-transformação das cepas com os vetores para a CL e CH simultaneamente. Para este fim, as células das cepas *GS115* e *KM71* estocadas a -80°C foram crescidas em meio YPD sólido (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose, 1,5% ágar) a 30°C por 48 horas. Uma colônia isolada de cada cepa foi crescida em 50 mL de meio YPD líquido (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose) a 30°C, 250 rpm até a densidade óptica (D.O) de 0,8-1,0 (em 600 nm). A transformação das cepas foi através do método por

cloreto de lítio, conforme recomendado no manual da *P. pastoris* (Invitrogen, 2014) com 2,5 µg do DNA para a CL e 2,5 µg DNA para a CH, simultaneamente, para cada alíquota de 50 uL de células em suspensão.

O volume total de células de cada co-transformação foi plaqueado em meio mínimo sólido [1,34% YNB (*Yeast Nitrogen Base* – Invitrogen), 2% glicose, 1,5% ágar] sem histidina, uma vez que as cepas de *P. pastoris* têm mutação no gene histidinoldehidrogenase (His4), somente as células transformantes irão crescer na ausência de histidina, já que o vetor pPIC9K possui este gene; este meio foi suplementado com zeocina (100 µg/mL), a fim de selecionar também, os transformantes com o vetor pPICZα. As placas foram incubadas a 30°C por 3-5 dias e as colônias resultantes foram respectivamente distribuídas em placas com meio sólido rico (YPD ágar) contendo concentrações gradativas dos antibióticos seletivos para os dois vetores (100, 250, 500, 1000 µg/mL de zeocina e de geneticina) a fim de selecionar a inserção de múltiplas cópias de ambos os genes no genoma das *P. pastoris* transformantes, característica que confere resistência para estas células em altas concentrações de antibiótico. Com isso, as colônias resultantes das placas contendo as maiores concentrações de antibiótico foram utilizadas nos testes de indução (item 3.2.3).

3.2.3 Ensaios para padronização da expressão em sistema eucarioto

Para os testes de expressão em *P. pastoris*, três colônias transformadas com os genes do fragmento Fab Palivizumabe, resultantes da placa com a maior concentração dos antibióticos e uma colônia do fragmento Fab do Palivizumabe e uma do Motavizumabe, resultantes de placas com a menor concentração dos antibióticos, foram crescidas em 25 mL de meio tamponado BMGY (*Buffered Glycerol-complex Medium*) (1% extrato levedura, 2% peptona, 0.1M fosfato de potássio pH 6,0, 1,34% YNB, 4×10^{-5} % biotina, 0,004% histidina, 1% glicerol) até a D.O_{600nm} 6,0 a 29°C, 250 rpm (*Shaker: Infors HT Multitron*). As células foram coletadas por centrifugação (5 minutos, 2.000 xg, 4°C – centrífuga *Eppendorf*: 5430 R) e ressuspensas em meio de indução tamponado BMMY (*Buffered Methanol-complex Medium*) (1% extrato levedura, 2% peptona, 0.1M fosfato de potássio pH 6,0, 1,34% YNB, 4×10^{-5} % biotina, 0,004% histidina, 1% metanol) em volume

adequado para alcançar uma D.O_{600nm} 2,0 (aproximadamente 100 mL) e novamente submetidas às mesmas condições de incubação anterior por um período de 144 horas. O meio foi suplementado com 1% de metanol a cada 24 horas; em cada um destes intervalos foi retirado alíquotas de 1 mL, totalizando 5 alíquotas.

Logo após o período final da indução, as amostras foram preparadas para análise conforme descrito no item 3.4. As induções dos controles positivo e negativo foram realizadas com as mesmas condições e volumes das amostras. As induções com 500 mL de meio foram realizadas nas mesmas condições descritas anteriormente, porém foi utilizado um pré-inóculo de 5 mL crescido por 16 horas, o qual foi diluído em 130 mL de meio e incubado até atingir a D.O_{600nm} 6,0. As células foram coletadas e ressuspensas no meio de indução, de modo a atingir a D.O_{600nm} 2,0, com a indução realizada como descrito anteriormente. O extrato para obtenção dos fragmentos purificados foi preparado conforme descrito no item abaixo (3.2.4).

3.2.4 Recuperação dos Fab recombinantes

As construções nos vetores de expressão para *P. pastoris* utilizados na produção dos fragmentos Fabs, foram feitas de forma que estas moléculas contivessem o peptídeo sinal do fator alfa, que permite a secreção das proteínas recombinantes para o meio extracelular. Desta forma, as proteínas produzidas em cultivo líquido estão altamente diluídas, sendo necessário realizar a recuperação/concentração destas proteínas; possibilitando deste modo, analisar o perfil proteico através de SDS-PAGE e *Western blot*, conforme serão descritos nos itens 3.4.

As células foram removidas do meio de cultivo através de centrifugação (3.000 xg, 15 minutos, 4°C, centrífuga *Sorvall Lynx 6000*, *Thermo Scientific*) e após a descontaminação adequada foram descartadas. O sobrenadante contendo as proteínas de interesse, foi alíquotado (Alíquotas de 15 mL para as induções de 100 mL e de 50 mL para as induções de 500 mL) e estocado a -20°C até ser purificado e posteriormente, utilizado nos imunoenaios. Para as análises em SDS-PAGE e *Western blot*, foram retiradas pequenas alíquotas de 500 µL e concentradas 5x em ultra filtros Amicon® de 0,5 mL (*Merk Milipore*) com *cutoff* de 10K (7.000 rpm, 4°C, centrífuga 5417R, *Eppendorf*) e estocadas a -20°C até a realização destas análises.

As demais alíquotas foram concentradas através da cromatografia de afinidade, com isso, conseqüentemente, ao mesmo tempo, foi realizado o passo inicial de purificação, como será detalhado no item abaixo (3.3).

3.3 ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO

No presente trabalho, foi realizada a cromatografia líquida em todas etapas de purificação, tanto para os antígenos quanto para os anticorpos monoclonais e policlonais. Nossa estratégia cromatográfica consiste numa etapa prévia, onde são realizadas as purificações em pequena escala, em bancada, de modo a padronizar as condições necessárias deste ensaio. Posteriormente, o protocolo é adaptado para purificações com volumes de escala média, onde todas foram realizadas no sistema de cromatografia ÄKTA-UPC 100 (*GE-Healthcare Life Sciences*).

Na etapa inicial de purificação foi utilizada a cromatografia de afinidade a metal imobilizado, por ser um tipo de cromatografia que possui uma interação forte e específica com a molécula alvo, já que nesta etapa a amostra se encontra em meio altamente complexo. Objetivando alto grau de pureza, num segundo momento, para os casos em que proteínas contaminantes ainda permaneceram juntamente com a proteína de interesse, foram realizadas as cromatografias de troca iônica, interação hidrofóbica e gel filtração (todas estão detalhadas nos itens abaixo). Após cada etapa cromatográfica, as proteínas foram analisadas por SDS-PAGE (conforme descrito no item 3.4.1) e/ou *Western blot* (conforme descrito no item 3.4.2).

3.3.1 Testes de purificação em bancada

Consiste numa etapa inicial em que a purificação é realizada manualmente na bancada em escala analítica, utilizando resinas em suspensão, com características semelhantes às aquelas utilizadas para empacotar as colunas cromatográficas. Nesta fase foram realizados os ajustes necessários para a otimização da interação da proteína de interesse com a coluna, as quais foram aplicadas em todas as etapas de purificação dos antígenos e anticorpos recombinantes utilizadas neste projeto, com exceção do gel filtração, por não existir resina em suspensão para este tipo de cromatografia. Normalmente, nesta fase, são

determinados os tipos de colunas a serem utilizadas, a composição e pH dos tampões ideais para cada proteína entre outros ajustes necessários, de modo a evitar perdas da proteína e tempo de trabalho, possibilitando o procedimento em maior escala no cromatógrafo, conforme descrito nos itens 3.3.2 e 3.3.3.

3.3.1.1 Purificação dos antígenos recombinantes

Neste ensaio, o extrato da fração solúvel, proveniente dos testes de indução (100 mL meio) foi diluído (1:1) no tampão de ligação (mesma composição do tampão de lise, descrito anteriormente no item 4.1.3) e incubado com 100 µL de resina (*His Pur Ni-NTA resin, Thermo Scientific*), previamente equilibrada no mesmo tampão, por 1 hora a 4°C sob agitação constante. Durante este procedimento deve ocorrer a ligação da proteína de interesse com a resina.

Após este período foram realizadas três lavagens com 1 mL do tampão de ligação a 4°C por 5 minutos sob agitação, a fim de remover as ligações inespecíficas (contaminantes), sendo a resina recuperada através de centrifugações (700 xg, 1 minuto, 4°C). A eluição (recuperação da proteína de interesse) se deu com 200 µL do tampão de ligação acrescido de 500 mM de imidazol (eluente) por 15 minutos, 4°C sob agitação. Após a adição do inibidor de protease (coquetel – Roche, suplementado com 2 mM de EDTA), cada fração coletada ao longo destes procedimentos foi armazenada a -20°C para análises posteriores por SDS-PAGE e *Western blot* (itens 3.4.1 e 3.4.2). Foram também realizados testes de purificação com as proteínas solubilizadas dos corpos de inclusão, nas mesmas condições descritas anteriormente.

Para os testes de purificação em bancada referente à segunda etapa cromatográfica (troca iônica ou interação hidrofóbica) foi necessário fazer a troca de tampão, visto que a proteína se encontrava no tampão da primeira etapa cromatográfica, o qual é inadequado para a etapa seguinte; normalmente esta troca de tampão é realizada por diálise ou diluição. Neste tipo de purificação a coluna deve ser escolhida de acordo com o pI da proteína e o pH do tampão.

Neste trabalho, a troca de tampão foi feita por diluição. Para este fim, alíquotas de 100 µL da fração mais pura da afinidade foram diluídas 5x em tampões com baixa concentração de sal (50 mM Tris-HCl pH 8,0, o qual variou de acordo com o pI da proteína a ser purificada, 50 mM NaCl, 5% glicerol, 2 mM EDTA, 1 mM DTT,

0,5 mM PMSF). As resinas testadas foram: *SP-sepharose*, *Q-sepharose* e *Phenil-sepharose* (*GE Healthcare Life Sciences*).

Logo após a diluição, as amostras foram centrifugadas (20.000 xg, 15 minutos, 4°C) para eliminar eventuais precipitados e o sobrenadante recuperado foi incubado com as resinas (previamente equilibradas em tampão de ligação), por 30 minutos a 4°C sob agitação. Em seguida foram feitas três lavagens de 5 minutos no tampão de ligação, seguida pela eluição com 100 µL do tampão de ligação acrescido de 1M de NaCl (eluente), por 15 minutos sob agitação constante.

Alíquotas de 10 µL de cada fração foram utilizadas para análise em SDS-PAGE, o que possibilitou a escolha de colunas capazes de fornecer melhor rendimento e pureza, assim como em evitar tampões que causam a precipitação da proteína; com isso, foi realizada a continuidade desta etapa em escala maior, no cromatógrafo (item 3.3.2, 3.3.3).

3.3.1.2 Purificação do fragmento Fab recombinante

Neste ensaio, 15mL de extrato proveniente do sobrenadante do meio de cultivo da indução por *P. pastoris* foi diluído (1:1) no tampão de ligação (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 0,05% Tween-20, 5 mM imidazol) e incubado com 500 µL de resina IMAC (Ni-NTA – *Thermo Scientific*), paralelamente, o mesmo volume foi incubado com outro tipo de resina IMAC (Ni *Sepharose fast flow* – *GE Healthcare Life Sciences*) por três horas sob agitação constante a 4°C.

Após este período foram realizadas quatro lavagens com 1 mL do tampão de ligação acrescido de 0,05% Tween-20 a 4°C por 5 minutos sob agitação, a fim de remover as ligações inespecíficas (contaminantes), sendo a resina recuperada através de centrifugações (300 xg, 1 minuto, 4°C) em todas as etapas deste procedimento. A recuperação da proteína de interesse foi realizada com 0,5 mL do tampão de eluição (50 mM Tris-HCl pH 6,7, 0,5 M NaCl, 0,5 M imidazol, 0,1% Tween-20, 10% glicerol) por 20 minutos, sob agitação constante a 4°C. Foram retiradas alíquotas de cada etapa deste procedimento para análises posteriores através de SDS-PAGE e *Western blot* (itens 3.4.1 e 3.4.2).

3.3.2 Cromatografia de afinidade em sistema ÄKTA

O extrato da fração solúvel de *E. coli* ou o meio contendo os fragmentos dos anticorpos, ou ainda as proteínas solubilizadas dos corpos de inclusão, foram aplicados no sistema ÄKTA Purifier (*GE Healthcare Life Sciences*) sob um fluxo constante de 0.5 mL/min em coluna His-trap HP (1 mL para os antígenos e 5 mL para o fragmento recombinante Fab) (*GE Healthcare Life Sciences*), que tem como metal imobilizado o níquel. A coluna foi previamente equilibrada com 5 volumes de coluna (CV) do tampão de ligação. Para evitar contaminação, entre a purificação de antígenos diferentes, foi feita a substituição do níquel antigo por um novo, utilizando uma solução de sulfato de níquel. Os anticorpos possuíam coluna exclusiva.

Após a passagem do volume total de extrato pela coluna, iniciou-se o gradiente de lavagem; realizado com baixa concentração do agente eluente. Normalmente neste tipo de cromatografia é utilizado o eluente imidazol (*Sigma-Aldrich*), cuja afinidade pelo metal aumenta de acordo com sua concentração, que a partir de um determinado gradiente pode ser superior a afinidade da histidina pelo metal, ocasionando a eluição da proteína. O gradiente de lavagem, neste caso, foi de 20 a 70 mM de imidazol em 20 CV com fracionamento de 5 mL. Em seguida tem-se o gradiente de eluição, o qual vai de 70 a 500 mM de imidazol em 10 CV, com fracionamento de 1,5 mL.

Logo após o fracionamento, os tubos foram imediatamente acondicionados em gelo e nas frações que continham a proteína de interesse foi adicionado o coquetel inibidor de protease suplementado com EDTA (2 mM) (somente para os antígenos) e retirado alíquotas de 50 µL de cada fração para análise por SDS-PAGE. Com isto, a amostra ficou apta à próxima etapa cromatográfica, conforme descrito no item 3.3.3.

No caso do fragmento recombinante Fab, a fim de remover os reagentes desta etapa cromatográfica, foi realizado a diálise (membrana *SnakeSkin™ Dialysis Tubing*, 10K MWCO – *Thermo Fisher Scientific*) contra 100 vezes o volume inicial, em tampão salino fosfato (PBS) suplementado com 0,1% Tween-20 e 20% glicerol (para prevenir eventuais agregações das moléculas) por 16 horas a 4°C, em seguida foram quantificados conforme o item 3.4.3, alíquotados e utilizados para a cromatografia por gel filtração ou armazenados a -20°C para realização dos imunoenaios (descrito no item 3.6).

3.3.3 Cromatografia de troca iônica no sistema ÄKTA

Este tipo de cromatografia foi realizado somente para os antígenos recombinantes. As frações resultantes da cromatografia de afinidade, após serem analisadas por SDS-PAGE foram descongeladas em gelo com água, e como rotineiramente, foi realizado um *pool* das frações mais puras, seguido pela troca de tampão (diluição 7 vezes o volume inicial e centrifugação – 20.000 xg, 20 min, 4°C), determinado com base em testes prévios de bancada.

A amostra foi aplicada no sistema ÄKTA sob um fluxo constante de 0,5 mL/min em coluna Hi-trap Q HP 1 mL (*GE Healthcare Life Sciences*) ou Hi-trap SP HP 1 mL (*GE Healthcare Life Sciences*), as quais são colunas de troca aniônica e catiônica, respectivamente. O equilíbrio químico da coluna foi feito de acordo com as instruções contidas no manual do fabricante.

Após aplicação da amostra foram realizadas lavagens em tampão contendo 0,05 M NaCl em 20 CV, com fracionamento de 5 mL, seguido do gradiente de eluição (0,05 a 1 M de NaCl) em 10 CV com fracionamento de 1,5 mL.

Após o fracionamento foi adicionado inibidor de protease nas frações contendo a proteína de interesse, retiradas alíquotas de 100 µL para o SDS-PAGE, dialisadas nas mesmas condições e tampões descritos para o fragmento Fab, quantificadas (item 4.5), alíquotadas e armazenadas a -20°C para imunização dos camundongos (item 3.5) ou utilização como controle positivo nos imunoenaios (item 3.6).

3.3.4 Cromatografia por gel filtração

Este tipo de cromatografia, também conhecido como exclusão por tamanho, foi realizada somente para o fragmento Fab recombinante. Alíquotas de 0,5mL (volume máximo para o tipo de coluna utilizada) proveniente da cromatografia por afinidade, previamente preparadas (conforme descrito acima), foram aplicadas individualmente, no sistema ÄKTA sob um fluxo constante de 0,8 mL/min em coluna Superdex 75 10/300 (*GE Healthcare Life Sciences*). O equilíbrio químico da coluna, assim como os parâmetros para o método, foi realizado de acordo com as instruções contidas no manual do fabricante. O tampão utilizado nesta cromatografia foi o

mesmo em que a amostra foi dialisada (conforme descrito acima) com fracionamento de 0,5 mL até o final do método.

Como este método separa as proteínas com base em seu tamanho, não dependendo de interações químicas, utiliza-se um único tampão durante todo o procedimento, o qual não necessita de aditivos ou pH específicos. Devido a isso, pode ser usado o tampão mais adequado à proteína de interesse, dispensando a etapa de diálise. Porém, devido à diluição da amostra durante sua passagem ao longo da coluna, é necessário concentrar as frações, que foram realizadas nas mesmas condições descritas anteriormente para o extrato proveniente da indução. Após este procedimento, as alíquotas foram utilizadas para as análises em SDS-PAGE e *Western blot* ou armazenadas a -20°C para utilização nos imunoenaios (item 3.6).

3.4 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

3.4.1 SDS-PAGE

A fim de analisar o nível de expressão, a presença e rendimento proteico nas frações solúveis e insolúveis de cada antígeno recombinante e dos fragmentos Fabs secretados das *P. pastoris*, frente às diferentes condições testadas (conforme os itens 3.1.2 e 3.2.3), alíquotas provenientes de cada ensaio foram aplicadas em géis de poliacrilamida (13% para as proteínas com peso molecular acima de 30 kDa e 15%, para as proteínas abaixo de 30 kDa).

A amostra foi preparada conforme descrito por Laemmli (1970), com tampão de amostra (1:4) e 3-7 µL amostra (de acordo com o tipo de extrato aplicado), aquecidas a 95°C por 5 minutos, com um curto ciclo de centrifugação. O volume total preparado (cerca de 10 µL) foi aplicado em géis de poliacrilamida com 0,75 mm de espessura e submetidos a corrente elétrica de 30 mA, através do sistema de eletroforese da *Bio-Rad*.

Após a corrida os géis foram corados com azul de *Coomassie* (R-250) sob agitação por 30 minutos e descorados em solução de descoloração lenta (4% de metanol, 7,5% de ácido acético, 88,5% de água destilada) sob agitação branda, com 2 trocas desta solução, até o gel ficar translúcido. Adicionalmente, a fim de certificar

a presença da proteína de interesse na fração solúvel e/ou insolúvel foram realizados ensaios de *Western blot*, conforme descrito no item 3.4.2.

3.4.2 *Western Blot*

Ensaio de *Western blot* foram realizados para confirmar a melhor condição de expressão e solubilidade dos antígenos em *E. coli*, verificadas no SDS-PAGE, bem como para testar os anticorpos policlonais e recombinantes e confirmar a expressão dos fragmentos Fabs em *P. pastoris*. Por ser uma técnica sensível, tem a capacidade de fornecer dados precisos em casos onde a análise por SDS-PAGE não é conclusiva; incluindo situações em que a proteína de interesse apresenta baixa expressão, baixo rendimento na fração solúvel, esteja altamente diluída ou co-localizada com outras proteínas.

Para este fim, alíquotas de 2 µL do extrato solúvel e 1 µL do insolúvel foram aplicados em géis de poliacrilamida nas mesmas condições descritas no item 3.4.1; porém, logo após a corrida de eletroforese os géis (sem sofrer coloração) foram utilizados imediatamente para a transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose (*Amersham Biosciences*) (20 volts por 40 minutos) em sistema semi-seco (*Trans-Blot SD semi-dry transfer cell*, *Bio-Rad*). Em seguida fez-se o bloqueio da membrana com 5% (p/v) de leite em pó desnatado (MOLICO® - Nestlé) diluído em tampão PBS-T (PBS 1x com 0,05% de Tween-20) por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação branda. A membrana foi então incubada com o mAb anti-6xHis (*Sigma-Aldrich*) diluído 1:3000 em PBS-T por 1 hora sob agitação, seguido da incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (*Sigma-Aldrich*) conjugado com fosfatase alcalina, diluído 1:5.000 em PBS-T nas mesmas condições do primário.

Após cada uma das etapas descritas anteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes em PBS-T por 5 minutos sob agitação branda. A revelação foi realizada em solução contendo 50 mg/mL BCIP (*Bromo-Chloro-Indolyl Phosphate*) e 50 mg/mL de NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*) (Promega) diluídas em 10 mL do tampão da fosfatase alcalina (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) por aproximadamente 60 segundos sob agitação branda. Após este período a reação foi interrompida com 10 mM EDTA em água destilada.

No caso dos fragmentos Fabs, foi realizado o *Western blot* para confirmação da expressão das cadeias leves e pesadas, uma vez que co-migram no SDS-PAGE. A cadeia leve foi confirmada pela reação com o anti-His; além da etiqueta 6xHis, possui também o epítipo c-Myc. A cadeia pesada, por não receber nenhuma destas etiquetas do vetor de expressão, foi detectada através da etiqueta FLAG, inserida em sua sequência nucleotídica durante a construção dos vetores.

3.4.3 Quantificação de proteínas

A determinação da concentração das proteínas purificadas foi feita no fluorímetro (Qubit™ - Invitrogen), conforme as instruções do fabricante e confirmada através de SDS-PAGE (como descrito no item 3.4.1) por comparação, tendo como referência uma proteína padrão (Albumina de soro bovino, BSA – *Sigma-Aldrich*) de massa conhecida (5 mg/mL) em diluições seriadas (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2 mg/mL). Após a quantificação, estas proteínas foram usadas para imunizar os camundongos (item 3.5.1) ou para os ensaios imunológicos (3.6).

3.5 OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS

Os anticorpos policlonais foram utilizados em todos os ensaios de validação, seja como moléculas de captura dos antígenos do HRSV quando presentes nas amostras clínicas, ou como moléculas intermediárias nos ensaios indiretos. Para estes fins, camundongos da raça *Swiss* foram imunizados com os antígenos HRSV-F1, HRSV-G e HRSV-N, sob a aprovação do comitê de bioética animal, licença número LW-18/16 (ANEXO 2).

3.5.1 Imunização dos camundongos e obtenção dos soros

Após a purificação, cada antígeno destinado a produção de anticorpos policlonais foram descongelados lentamente (gelo e água) e submetidos a duas diálises de 100 vezes o volume inicial, em PBS, 4°C, sob agitação lenta e contínua. A primeira diálise foi realizada por um período de 2 horas e a seguinte, nas mesmas condições da anterior, porém por um período de 16 horas. Findadas as diálises, os

antígenos foram novamente quantificados e esterilizados por filtração (0,22 µm) e mantidos em condições estéreis até o final da inoculação.

Antes do primeiro inóculo, foram retirados cerca de 50 µL de sangue total da cauda de cada animal a fim de realizar a análise pré-imune. Foi utilizado um animal para o controle negativo; neste caso, este animal foi imunizado apenas com o PBS e adjuvante, nas mesmas condições dos demais.

Cinco camundongos, para cada antígeno, com idade entre 6-8 semanas, foram imunizados via intraperitoneal com cinco inóculos de 50 µg de proteína num volume de 100 µL (0,5 µg/µL), sendo adicionado o mesmo volume do adjuvante completo de *Freund's (Sigma-Aldrich)* (no primeiro inóculo) e o mesmo volume de Alu-Gel-S 1,3% (Serva) nos demais inóculos. Deste modo, foi injetado o volume final de 200 µL (por inóculo) em cada animal imunizado. O intervalo entre os inóculos foram de 10 dias.

Após sete dias do último inóculo, com os animais sob anestesia geral profunda (Quetamina: 50 mg/Kg de camundongo, Xilazina: 5 mg/Kg, Acepromazina: 0,5 mg/kg), foi realizada a coleta do sangue total através de punção cardíaca, seguido da eutanásia dos animais por deslocamento cervical. Após a eutanásia, todos os animais foram submetidos a lavagem peritoneal com 6 mL de PBS cada, a fim de recuperar os anticorpos circulantes nesta região.

O sangue total de cada camundongo foi incubado por 15 minutos a 37°C, seguido por 2 ciclos de centrifugação a 7.000 rpm por 10 minutos. Os soros foram cuidadosamente coletados e distribuídos em alíquotas de 100 µL. Para o lavado peritoneal as alíquotas foram de 1,5 mL. Todas as alíquotas foram armazenadas a -20°C. Uma alíquota de cada anticorpo foi utilizada nas análises por *Western blot* (item 3.4.2) e para os testes de purificação (item 3.5.3).

3.5.2 Análise dos anticorpos policlonais do soro e lavado peritoneal

Os ensaios de *Western blot* foram realizados de acordo como descrito no item 3.4.2. a fim de confirmar a produção dos anticorpos policlonais pelos camundongos, para cada antígeno. Após a transferência e bloqueio, a membrana de nitrocelulose foi cortada em tiras, para incubação com diferentes diluições do soro (1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:3000), sendo estas mesmas diluições aplicadas também para o lavado peritoneal e controle negativo. Já para análise do soro pré-

imune foi utilizado somente a diluição mais concentrada (1:100). Uma vez confirmada a produção dos anticorpos policlonais, foram realizados os testes de purificação destes anticorpos do soro (item 3.5.3).

3.5.3 Purificação dos anticorpos policlonais

Devido a limitação dos volumes de soro obtidos em camundongos, os testes de purificação foram realizados em pequena escala. Para este fim, alíquotas do soro e lavado peritoneal foram precipitados com sulfato de amônio (*Sigma-Aldrich*) (para concentração final de 1,5 M) para uma purificação prévia dos anticorpos e consequentemente remoção da maior parte da albumina, componente e contaminante presente em alta quantidade no soro.

Os anticorpos precipitados foram recuperados por centrifugação (8.000 xg, 10 minutos, 4°C), ressuspendido em 500 µL de PBS-T (PBS com 0,05% Tween-20) e incubado com 100 µL de microesferas magnéticas acopladas a proteína G (*DynaBeads – Life Technology*) em solução, previamente equilibradas no mesmo tampão, por 30 minutos sob agitação constante a 4°C. Foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos com 1 mL de PBS-T e 2 eluições de 200 µL em glicina pH 2,7, sob agitação constante por 15 minutos, com posterior neutralização do pH com 1/10 volume de Tris-HCl pH 8.8 (2,5 M). Foi retirada uma alíquota de cada etapa para posterior análise por SDS-PAGE e o restante, armazenadas a -20°C, para utilização nos imunoenaios, conforme descrito no item 3.6.

3.6 VALIDAÇÃO DOS ANTÍGENOS E ANTICORPOS

O presente estudo focou na utilização de antígenos e anticorpos recombinantes para a realização dos imunoenaios de captura. As amostras clínicas foram utilizadas como apoio aos antígenos recombinantes, a fim de avaliar o potencial do fragmento Fab em detectar o antígeno nativo. O anticorpo comercial Palivizumabe, foi utilizado como referência em todos os ensaios realizados.

As amostras clínicas utilizadas para validação dos anticorpos foram cedidas pelo Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN/PR), referência estadual para o diagnóstico de doenças infecciosas, com prioridade para as doenças de notificação compulsória e de interesse epidemiológico, sanitário ou ambiental (LABORATÓRIO

CENTRAL DO ESTADO DO PARANÁ (LACEN), 2012). Não houve coleta de amostras para este projeto. As amostras aqui utilizadas provêm de uma demanda espontânea, que foram estocadas após os testes de diagnósticos realizados, estando passíveis à pesquisa científica. Nenhum dado do paciente foi mencionado, as amostras foram especificadas de acordo com códigos internos.

Para determinar a etiologia das infecções respiratórias agudas, o LACEN utiliza amostras coletadas através de *swab* combinado (nasofaringe/orofaringe), durante a fase aguda da doença, até cinco dias do início dos sintomas. Essa coleta é realizada exclusivamente com *swab de rayon*, sendo utilizado um *swab* diferente para cada uma das narinas e orofaringe, os quais, são acondicionados no mesmo frasco contendo meio de transporte viral. Neste procedimento é coletado um esfregaço de células, em que há ausência ou baixa quantidade de secreções nasais, já que o paciente deve assuar o nariz antes da coleta. As amostras são enviadas para o LACEN sob refrigeração, em até 24 horas após a coleta, visto que o material genético viral é extremamente lábil e, portanto, facilmente degradado pelo manuseio inadequado ou pela demora em seu processamento (LACEN, 2012).

O método de diagnóstico empregado pelo LACEN para as infecções respiratórias agudas virais é a qRT-PCR, *Multiplex*, realizado “*in house*” conforme o protocolo descrito em literatura para identificação simultânea de patógenos respiratórios (KIM et al., 2011). Na TABELA 5 estão descritos os oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizadas pelo LACEN para identificar os diferentes vírus respiratórios.

TABELA 5 – OLIGONUCLEOTÍDEOS E SONDAS USADOS PARA DETECÇÃO DOS VÍRUS RESPIRATÓRIOS PELO LACEN/PR

Assay¹	Primer/Probe Sequence (5' to 3')
Adenovirus	F² GCC CCA GTG GTC TTA CAT GCA CAT C
	R³ GCC ACG GTG GGG TTT CTA AAC TT
	P⁴ FAM-TGC ACC AGA CCC GGG CTC AGG TAC TCC GA
hMPV	F CAA GTG TGA CAT TGC TGA YCT RAA
	R ACT GCC GCA CAA CAT TTA GRA A
	P FAM-TGG CYG TYA GCT TCA GTC AAT TCA ACA GA
Influenza A	F GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C
	R AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA
	P FAM-TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG
Influenza B	F TCC TCA ACT CAC TCT TCG AGC G
	R CGG TGC TCT TGA CCA AAT TGG
	P FAM-CCA ATT CGA GCA GCT GAA ACT GCG GTG
PIV type 1	F AGT TGT CAA TGT CTT AAT TCG TAT CAA T
	R TCG GCA CCT AAG TAA TTT TGA GTT
	P FAM-ATA GGC CAA AGA "T"TG TTG TCG AGA CTA TTC CA ⁵
PIV type 2	F GCA TTT CCA ATC TAC AGG ACT ATG A
	R ACC TCC TGG TAT AGC AGT GAC TGA AC
	P FAM-CCA TTT ACC "T"AA GTG ATG GAA TCA ATC GCA AA
PIV type 3	F TGG YTC AAT CTC AAC AAC AAC AAG ATT TAA G
	R TAC CCG AGA AAT ATT ATT TTG CC
	P FAM-CCC ATC TG"TT" TGG ACC AGG GAT ATA CTA CAA A
RSV	F GGC AAA TAT GGA AAC ATA CGT GAA
	R TCT TTT TCT AGG ACA TTG TAY TGA ACA G
	P FAM-CTG TGT ATG TGG AGC CTT CGT GAA GCT

1. hMPV, human metapneumovirus; PIV, parainfluenza virus; RSV, respiratory syncytial virus.

2. F, forward primer.

3. R, reverse primer.

4. P, probe.

5. "T", internal quencher.

doi:10.1371/journal.pone.0021610.t002

FONTE: Kim et al. (2011)

Na TABELA 6 podem ser verificadas as amostras que compõem o painel cedido pelo LACEN, sendo todas estas amostras coletadas no ano de 2014. Outros vírus respiratórios, tais como metapneumovírus humano e influenza estão presentes no painel, pois foi avaliada também a possibilidade de reações cruzadas com o HRSV.

TABELA 6 – PAINEL DE AMOSTRAS CLÍNICAS CEDIDO PELO LACEN/PR PARA A VALIDAÇÃO DOS ANTICORPOS NOS IMUNOENSAIOS

HRSV	* HMPV	Influenza A	Influenza B	Negativo
33	32	36	33	36

FONTE: O autor (2017).

NOTA: * Metapneumovírus humano

Em todos os imunoensaios o anticorpo comercial Palivizumabe foi utilizado como referência padrão, já que o fragmento Fab é derivado deste anticorpo; além disso, é bem caracterizado e amplamente utilizado como prevenção da infecção pelo HRSV em humanos.

As alíquotas do Palivizumabe utilizadas ao longo de todos os ensaios, foram cedidas pelo Programa Mãe Curitibana (Secretária Municipal da saúde de Curitiba). Desde 2014, este programa da secretaria municipal de saúde está imunizando gratuitamente recém-nascidos e crianças pequenas, que fazem parte do grupo de risco para o HRSV. De acordo com as instruções da bula para uso em humanos, o medicamento deve ser usado no máximo até 6 horas após sua reconstituição, concentração final indicada é de 100 mg/mL. Decorrido este período, mesmo que o conteúdo do frasco não tenha sido totalmente utilizado (já que a dose é 15 mg/Kg de criança), o medicamento deve ser descartado; porém para pesquisa, ainda pode ser usado regularmente.

Com base no pressuposto acima, um frasco contendo 350 µL de anticorpos diluídos em água estéril (100 mg/mL) (Palivizumabe, Synagis, nº A493) foi cedido para utilização neste projeto. O produto foi transportado para o laboratório de Genômica Funcional (FIOCRUZ/PR) sob refrigeração (2-6°C). Esta solução foi diluída para uma concentração final de 5 mg/mL em PBS pH 7,2 acrescidos de 0,1% Tween-20 e 20% de glicerol; o volume total foi distribuído em alíquotas de 200 µL e armazenados a -20°C até a utilização nos imunoensaios, conforme especificado ao longo deste item.

3.6.1 Conjugação dos anticorpos com peroxidase

A enzima peroxidase tem sido muito utilizada em imunoenaios por fornecer sensibilidade superior às demais enzimas reveladoras. Com isso, esta molécula quando conjugadas com anticorpos específicos, permite a detecção direta dos antígenos virais presentes nas amostras clínicas, aumentando assim, consideravelmente a sensibilidade dos ensaios. Para a conjugação dos anticorpos com a Peroxidase (HRP - *Horseradish Peroxidase* - *Sigma-Aldrich*) foram utilizados os anticorpos Palivizumabe e o fragmento Fab recombinante. Os anticorpos policlonais não foram utilizados neste protocolo devido ao baixo rendimento obtido nas purificações dos soros dos camundongos (~0,2 mg/mL em 0,2 mL).

Dentre os vários protocolos existentes para este procedimento, foi testado o protocolo de conjugação de proteína/proteína com EDC-HCl e Sulfo-NHS, por ser o mais adequado para este tipo de ligação, já que o fragmento Fab por ser menor que a molécula completa, provavelmente possui menor quantidade de aminoácidos que permitem a ligação à HRP. As condições aqui testadas foram baseadas nas bulas dos reagentes necessários para o tipo de protocolo adotado (*CovaChem*, *Proteo Chem* e *G Biosciences*).

Os anticorpos a serem conjugados foram inicialmente diluídos no tampão de conjugação A (0,1 M MES pH 5,5), para um volume final de 0,5 mL cada, porém, em diferentes concentrações (2 mg/mL do Palivizumabe ou 0,5 mg/mL do fragmento Fab), de acordo com a quantidade disponível para cada caso, já que os mesmos também foram utilizados para a padronização de todos os imunoenaios indiretos. Em cada um dos frascos contendo os anticorpos foi adicionado o EDC-HCl, seguido do Sulfo-NHS (para uma concentração final de 4 e 10 mM, respectivamente - ambos da *Sigma Aldrich*) e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente sob agitação constante. Decorrido este período, foi acrescido em cada solução, 1 mg/mL da HRP, diluída no tampão de conjugação B (PBS 1x, pH 7,2) num volume final de 0,5 mL e incubado por três horas em temperatura ambiente, sob agitação constante em ausência de luz.

A remoção das moléculas de peroxidase que não se ligaram aos anticorpos foi realizada por meio de 3 lavagens com 0,5 mL do tampão de conjugação B, acrescido de 0,1% de Tween-20, através de ultra filtros Amicon® de 0.5 mL (Merk Milipore) com *cutoff* de 30 kDa (7.000 rpm, 4°C, centrífuga *Eppendorf*). Após as

lavagens, foram adicionados 30% de glicerol em cada tubo e o volume distribuído em alíquotas de 100 μ L, as quais foram armazenadas a -20°C até a realização dos imunoenaios, conforme descrito ao longo deste item. Para confirmação da ligação da peroxidase com os anticorpos, foi realizado *Western blot* (conforme descrito no item 3.4.2), porém, utilizando como substrato para revelação o luminol (*Super Signal™ West Pico Chemiluminescent Substrate - Thermo Fisher Scientific*) conforme as instruções do fabricante.

3.6.2 Ensaio de ELISA

Para uma primeira avaliação do desempenho dos antígenos e anticorpos foi realizada uma curva de diluição tanto de antígenos, quanto de anticorpos policlonais através do ELISA. Neste ensaio a diluição seriada dos antígenos foi: 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 ng/*well* dos antígenos RSV-F1, RSV-G e RSV-N. Estas proteínas foram dialisadas em tampão apropriado a este ensaio (50 mM Carbonato/Bicarbonato pH 9.2, 0,1% Tween-20, 20% glicerol) e utilizadas para sensibilizar as placas de ELISA (*UV plate, 96 well, No lid – Corning Incorporated*) por aproximadamente 16 horas à 4°C. As placas foram lavadas 3 vezes com 100 μ L de PBS-T por poço e bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado (molico - Nestlé) diluído em PBS-T por 60 minutos em temperatura ambiente, sucedido de 3 lavagens com PBS-T e incubação com 100 μ L do soro dos camundongos, por poço, diluídos em PBS-T (1: 2000). A reação ocorreu por 60 minutos em temperatura ambiente, seguido de 3 lavagens. Como controle positivo foi utilizado o anticorpo anti-His. O branco foi realizado com as mesmas concentrações de antígenos.

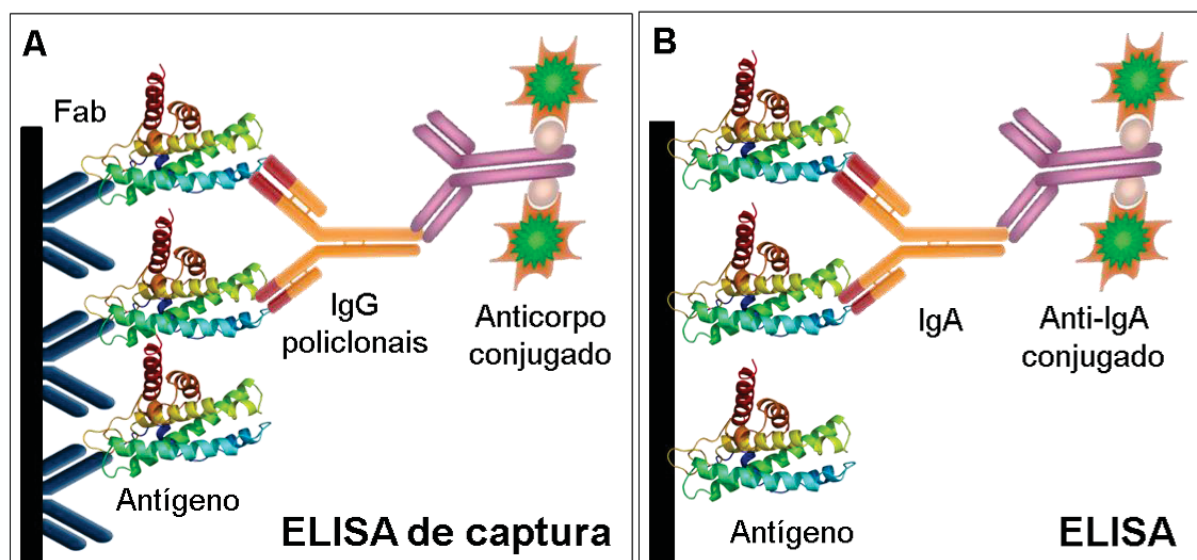
Para o ensaio de diluição dos anticorpos, as microplacas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 ng/poço de cada antígeno, os quais foram incubados com diferentes diluições do soro (1:100, 1:500, 1:1000, 1:2500, 1:5000, 1:7500, 1:10000), mas mesmas condições descritas acima.

Para detecção da interação, em cada poço foi aplicado o anticorpo anti-IgG camundongo conjugado com fosfatase alcalina (AP – Sigma-Aldrich) (1:3000) e incubado por 60 minutos. Após 3 lavagens, foram adicionados 100 μ L da solução reveladora, contendo o substrato pNPP (Sigma-Aldrich) para a fosfatase por 30 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi realizada no leitor de microplacas Synergy H1 (*Biotek*) em 405 nm.

Os ensaios de ELISA de captura (FIGURA 10A), foram realizados nas mesmas condições descritas acima. Neste ensaio utilizou-se os anticorpos para sensibilizar as placas e posteriormente, estes foram incubados com seus respectivos antígenos recombinantes ou com as amostras clínicas, conforme as combinações presentes na TABELA 7.

Foram realizados também ensaios onde os antígenos recombinantes (F1) ou as amostras clínicas foram utilizadas para sensibilizar as placas (FIGURA 10B). Neste caso, foram incubados com os anticorpos policlonais, Palivizumabe ou fragmento Fab recombinante e posteriormente com anticorpos comerciais conjugados com fosfatase alcalina ou FITC que reconhecem especificamente, cada um destes anticorpos. Foram realizados ainda, ensaios para detectar o IgA, sendo que para estes, as amostras clínicas aderidas na placa foram incubadas com anticorpos anti-IgA humana conjugado com FITC. As amostras humanas utilizadas nestes ensaios foram reunidas num *pool*.

FIGURA 10 – ESQUEMA DAS DIFERENTES COMBINAÇÕES DE MOLÉCULAS NOS ENSAIOS DE ELISA



A) Componentes da reação tendo anticorpos (fragmento Fab) imobilizados na placa a fim de capturar as partículas virais presentes nas amostras testadas, o que pode ser detectado pela reação com os anticorpos conjugados. B) Componentes da reação tendo antígenos imobilizados na placa a fim de capturar os IgAs presentes nas amostras a testadas, o que pode ser detectado pela reação com o anticorpo conjugado anti-IgA. FONTE: O autor (2017).

TABELA 7– DIFERENTES COMBINAÇÕES DE MOLÉCULAS DOS ENSAIOS ELISA

Ensaio	Molécula Imobilizada	Incubação 1 (Captura)	Incubação 2 (intermediário)	Incubação 3 (Conjugado)
1	F1 recombinante	Anti-F1 policlonal	NA	Anti-IgG mouse-AP
	G recombinante	Anti-G policlonal	NA	Anti-IgG mouse-AP
	N recombinante	Anti-N policlonal	NA	Anti-IgG mouse-AP
2	Antígeno F1 recombinante	Fragmento Fab	Anti-FLAG IgG Mouse	Anti-IgG mouse-AP
	Antígeno F1 recombinante	Palivizumabe	NA	Anti-IgG Humana-AP
3	Fragmento Fab	F1 recombinante	Anti-F1 policlonal	Anti-IgG mouse-AP
	Palivizumabe	F1 recombinante	Anti-F1 policlonal	Anti-IgG mouse-AP
4	Fragmento Fab	Swab nasal	Anti-F1 policlonal	Anti-IgG mouse-AP
	Palivizumabe	Swab nasal	Anti-F1 policlonal	Anti-IgG mouse-AP
5	Swab nasal	Anti-F1 policlonal	NA	Anti-IgG mouse-AP
	Swab nasal	Palivizumabe	NA	Anti-IgG Humana-AP
	Swab nasal	Fragmento Fab	Anti-FLAG IgG Mouse	Anti-IgG mouse-AP
6	Swab nasal	NA	NA	Anti-IgA Humana-FITC

FONTE: O autor (2017).

3.6.3 Ensaios no sistema *Luminex*

A fim de estabelecer a melhor condição para os ensaios no *Luminex*, foram testadas várias condições em cada etapa deste método, variando as concentrações de anticorpos e amostras clínicas, assim como a composição dos tampões de acoplamento. Nestes ensaios de padronização, foi utilizado um *pool* de amostras clínicas positivas e um *pool* de negativas, a fim de minimizar a quantidade de amostras em razão das diferentes condições testadas. Para estabelecer o melhor parâmetro de captura das proteínas virais, foi avaliado o desempenho dos anticorpos anti-F policlonal, do Palivizumabe e do fragmento Fab, acoplados individualmente

nas microesferas ou como agentes intermediários de revelação, como especificado na TABELA 8.

TABELA 8 – DIFERENTES COMBINAÇÕES DE ANTICORPOS REALIZADOS NOS ENSAIOS DO SISTEMA *LUMINEX*

Ensaio	Molécula Imobilizada	Incubação 1 (Captura)	Incubação 2 (intermediário)	Incubação 3 (Conjugado)
1	Palivizumabe	Swab nasal	Anti-F1 policlonal	Anti-IgG mouse-PE
	Palivizumabe	Swab nasal	Palivizumabe	Anti-IgG Humana-PE
	Palivizumabe	Swab nasal	Fragmento Fab + anti-myc	Anti-IgG mouse-PE
2	Anti-F1 policlonal	Swab nasal	Anti-F1 policlonal	Anti-IgG mouse-PE
	Palivizumabe	Swab nasal	Anti-F1 policlonal	Anti-IgG mouse-PE
	Fragmento Fab	Swab nasal	Anti-F1 policlonal	Anti-IgG mouse-PE

FONTE: O autor (2017).

Para que ocorra o acoplamento (ligação da molécula de interesse com as microesferas), é necessária uma etapa prévia de ativação (carbonilação) das microesferas, preparando-as quimicamente para que ocorra a ligação com os grupamentos aminas dos anticorpos. Para isso, uma quantidade de 50.000 microesferas (*Luminex, Austin, Texas, EUA* - concentração estoque: 12.500.000 microesferas/mL) por poço utilizado (sendo 96 poços por placa), foram inseridas em microtubos (*low binding corning – eppendorf*) e diluídas (1:20) com o tampão de ativação específico (*Luminex, Austin, Texas, EUA*). Após duas lavagens no tampão de ativação, as microesferas foram ressuspensas no mesmo volume inicial deste mesmo tampão. Nesta solução foi adicionado o sulfo-NHS seguido do EDC-HCl (ambos da Sigma-aldrich), para uma concentração final de 5 mg/ml de cada. Foram incubados por 20 minutos, 25°C, sob agitação de 800 rpm, em ausência de luz e lavados duas vezes nas mesmas condições descritas acima.

As microesferas ativadas foram então distribuídas na placa, levando em conta a quantidade inicial de microesferas por poço, onde foi adicionado 100 µL do tampão de acoplamento, contendo os anticorpos a serem acoplados, nas

concentrações de 0,25; 50 e 100 µg/mL. Cada uma destas concentrações, foram testadas em tampões de acoplamento diferentes (MES pH 5,5, PBS pH 7,2, fosfato de sódio pH 7,4 e carbonato de sódio pH 9,0). Esta reação de acoplamento foi realizada por duas horas a 37°C, 300 rpm. Ao fim deste período, foram feitas 3 lavagens de 100 µL cada em tampão de bloqueio (PBS pH 7,2, 1% BSA, 0,02% Tween-20, 0,01% NaN₃), a fim de evitar as ligações não específicas.

Para incubação das microesferas acopladas com os diferentes anticorpos, foram testadas diferentes diluições tanto do *pool* de amostras negativas quanto de positivas (1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600) (em tampão PBS-TBN, contendo extrato de *E. coli* na concentração de 0,2 mg/mL, para bloqueio de sinais inespecíficos) para cada um dos anticorpos acoplados. A reação foi incubada por 15 minutos à 37°C sob agitação de 300 rpm, em ausência de luz; seguida de 3 lavagens de 100 µL cada, com o tampão de bloqueio.

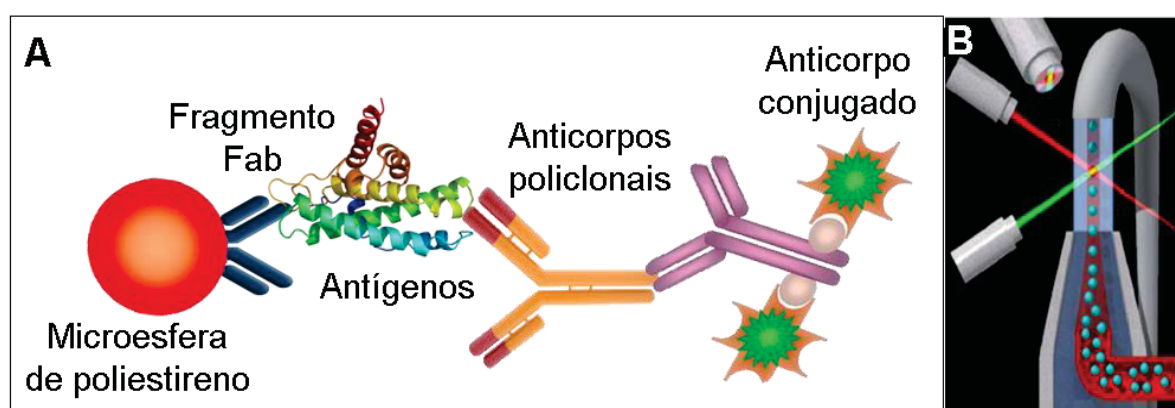
Devido às características deste ensaio de captura, foi necessária a realização de um passo adicional de incubação com os anticorpos específicos para interagir com as proteínas virais quando presentes nas amostras, intermediando a etapa de detecção. Para isso, foram testados os anticorpos anti-F policlonal (IgG camundongo) e o Palivizumabe (IgG humana), com diluição de 1:1.000 no tampão de bloqueio, com a incubação e lavagens nas mesmas condições descritas acima.

A detecção destas reações foi através de método indireto, que consiste na utilização de anticorpos conjugados com fluoróforos específicos, que possibilitam a detecção da reação entre as moléculas deste ensaio, nos casos em que as proteínas virais específicas estão presentes na amostra analisada (amostras positivas) (FIGURA 11A). Para este fim, em cada poço foram adicionados 100 µL do anticorpo anti-IgG de camundongo (nos casos em que foi utilizado o policlonal anti-F no passo intermediário) ou anti-IgG humana (quando utilizado o Palivizumabe), ambos conjugados à R-Ficoeretrina (*Moss Inc, Maryland, EUA*), diluídos no tampão de bloqueio (1:500-1:10.000) com incubação e lavagens conforme descrito anteriormente. Pelo fato das microesferas serem paramagnéticas, as lavagens são realizadas retirando o líquido quando as placas são postas sobre um suporte magnético, de forma que as microesferas ficam retidas no fundo de cada poço.

A última lavagem foi realizada com 200 µL por poço do tampão *Sheath fluid* (*Luminex - Austin, Texas, EUA*), que é o tampão recomendado para leitura, pela empresa fabricante do equipamento. Um total de 100 microesferas aleatórias de

cada poço da placa são passadas individualmente pela sonda do equipamento *Luminex200* (*Luminex - Austin, Texas, EUA*) onde incide o laser classificador (635 nm) e o indicador (532 nm) (manual de operação Biometrix – *Luminex 200*) (FIGURA 11B); o primeiro laser identifica o código da microesfera e o outro a presença ou não de sinal (ou intensidade de fluorescência) da reação, que é gerada pelo anticorpo conjugado (FIGURA 11A). Poços contendo < 35 microesferas, são descartados da análise. Os dados são gerados em mediana da intensidade de fluorescência (MFI) e são posteriormente analisados por programas estatísticos.

FIGURA 11 – ESQUEMA DAS MOLÉCULAS E DO LEITOR DO SISTEMA *LUMINEX*



A) Componentes da reação tendo anticorpos (fragmento Fab) imobilizados nas microesferas a fim de capturar as partículas virais presente nas amostras testadas. B) Leitura das microesferas após as reações, pelo equipamento da *Luminex*, mostrando os dois *lasers* que incidem sobre cada uma das microesferas conforme passam pela sonda. FONTE: O autor (2017).

3.6.4 Ensaios de *Western blot* com amostras clínicas

Ensaios de *Western blot* utilizando amostras clínicas também foram realizados. Por ser um método que é ainda muito utilizado, poderia corroborar com os resultados dos outros ensaios realizados. Foi necessário variar as condições de todas as etapas deste ensaio em relação àquelas descritas no item 3.4.2, porém, mantendo as mesmas etapas, os mesmos reagentes e equipamentos já descritos neste item. Com isso, num primeiro momento, a fim de padronizar as condições ideais para este tipo de ensaio, foi utilizado *pool* de amostras positivas e um *pool* de amostras negativas. Foram utilizados como controle positivo da reação, os antígenos recombinantes. Neste ensaio foram avaliados também o desempenho dos anticorpos anti-F1, anti-G, anti-N (policlonais, IgG de camundongo), Palivizumabe e

o fragmento Fab recombinante. Devido ao *Western blot* ser um método manual laborioso e demorado, após sua padronização, o *pool* de amostras foi aberto utilizando somente 8 amostras de cada grupo (HRSV positivo, metapneumovírus humano, influenza e amostras negativas) (TABELA 9), do total de amostras cedidas.

TABELA 9 – AMOSTRAS CLÍNICAS UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE *WESTERN BLOT*

Patógeno	Código amostra	CT	Idade
HRSV	4194	31	Criança
	4223	12	Adulto
	4236	32	Criança
	4275	15	Adulto
	4383	32	Criança
	4414	15	Criança
	4451	16	Criança
	4728	32	Criança
HMPV	4382*	24	Criança
	4549	36	Adulto
	4556	24	Criança
	4565	35	Idoso
	4607	35	Criança
	4710	24	Criança
	4784	20	Idoso
	5056	36	Criança
Influenza A	4619	20	Adulto
	4791	33	Adulto
	4941	34	Criança
	4955	20	Adulto
Influenza B	4273	33	Adulto
	4491	32	Adulto
	4503	21	Adulto
	4631	21	Idoso
Negativas	4574	-	Adulto
	4579	-	Idoso
	4580	-	Adulto
	4588	-	Adulto
	4592	-	Adulto
	4593	-	Adulto
	4665	-	Adulto
	4666	-	Adulto

FONTE: O autor (2017).

NOTA: CT – *Ciclo Thresbold*, valor relacionado aos ciclos do PCR em tempo real, em que a reação atinge o limiar da fase exponencial. Valores de alto CT correspondem a carga viral baixa e baixo CT correspondem a carga viral alta.

HMPV – Metapneumovírus humano.

As idades dos pacientes foram divulgadas da seguinte forma: crianças (pacientes < 12 anos), adultos (pacientes entre 12-65 anos) e idosos (pacientes >65 anos).

* amostra positiva para HMPV e HRSV (coinfecção).

Para realização deste ensaio, 10 µL de cada amostra clínica analisada foi acrescida de 5 µL do tampão de amostra 4x e submetidas a 95°C, 300 rpm por 5 minutos e o volume total aplicado em gel de poliacrilamida (13%) de 1mm. A transferência para membrana de nitrocelulose se deu em sistema semiúmido à 20 Volts por 60 minutos. As membranas foram incubadas em tampão de bloqueio (TBS pH x, 0,05% de Tween-20, 3% de BSA) por 60 minutos em temperatura ambiente sob agitação branda. Após 3 lavagens de 20 mL por membrana em TBS (Tris borato, pH 8, 0,05% Tween-20), sob agitação por 5 minutos, as membranas foram incubadas com os anticorpos diluídos no tampão de bloqueio (policlonais: 1:3000, Palivizumabe: 5 µg/mL e fragmento Fab: 10 µg/mL) sendo 10 mL por membrana ou 1,5 mL por canaleta, nos casos em que foi necessário cortar a membrana em tiras para incubação em condições distintas.

No caso do Fab foi necessário um passo adicional de incubação (60 minutos, temperatura ambiente, sob agitação constante) com o anticorpo anti-FLAG (*Sigma-Aldrich*, IgG de camundongo, 1:2500); por ser um fragmento Fab não contém a fração Fc, a qual é reconhecida pelo anti-IgG humana. Após as lavagens realizadas conforme descritas acima, as membranas foram incubadas com os anticorpos anti-IgG de camundongo (*Sigma-Aldrich*, 1:5000, para os anticorpos policlonais e fragmento Fab) e anti-IgG humana (Sigma, 1:20.000, para o Palivizumabe) ambos conjugados com fosfatase alcalina, por um período de 60 minutos em temperatura ambiente e agitação constante. A revelação foi realizada com 5 mL por membrana da solução de revelação (BCIP/NBT *Color Development Substrate: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium*, Promega Corporation) conforme as instruções do fabricante. As imagens das membranas foram capturadas no transluminador *Chemi express L-Pix* (Loccus).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Brasil há uma extrema necessidade no desenvolvimento de insumos para diagnósticos (MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, 2012), pois os processos para importação, além de serem demorados, encarecem muito o produto, o que dificulta o acesso da população aos testes disponíveis no mercado.

Em se tratando de infecções respiratórias, o caso é ainda mais crítico, pois além do custo elevado, os testes comerciais possuem várias limitações (BRUNING et al., 2014; COLLINS; POLLARD, 2002; PRENDERGAST; PAPENBURG, 2013; STOCKTON et al., 1998; VIGNALI, 2000), fazendo com que o custo-benefício inviabilize sua aquisição pelo sistema único de saúde e deixando desta forma a população sem os cuidados adequados.

Estas infecções podem ser causadas por vírus, bactérias e eventualmente por fungos (EARL; AN; RYAN, 2015) e devido às semelhanças dos sintomas e a falta de diagnósticos específicos, são todas tratadas da mesma forma. Com isso, a infecção pode agravar-se ainda mais ou ser transmitida para outras pessoas (AKHTER; JOHANI, 2011; BAWAGE et al., 2013; PRENDERGAST; PAPENBURG, 2013; BRUNING et al., 2014). Através do diagnóstico molecular, que são os mais sensíveis existentes atualmente (CHARTRAND; TREMBLAY; RENAUD, 2015; GINOCCHIO; MCADAM, 2011; JONCKHEERE et al., 2015; PICHÉ-RENAUD et al., 2016), foram identificados vírus em > 90% dos casos de bronquiolite nos recém nascidos hospitalizados, sendo o HRSV o vírus de maior frequência, já que 47% dos casos são atribuídos a todos os demais vírus (RODRIGUEZ; RAMILO, 2014).

Entretanto, os testes moleculares, na maioria das vezes, não chegam até as populações ou regiões mais carentes e distantes. Um teste de diagnóstico ideal, além de eficaz, deve ser acessível e de baixo custo, permitindo uma vasta cobertura populacional, tais como os RADTs. Porém, em relação ao HRSV, a limitação deste teste está relacionada a inespecificidade das moléculas utilizadas como matéria-prima. Sendo, portanto, necessário o desenvolvimento de novas moléculas para otimização destes testes.

Com base nisso, construímos vetores para expressão dos três antígenos mais imunogênicos do HRSV em *E. coli*, os quais possibilitaram a obtenção dos anticorpos policlonais. Estes anticorpos, juntamente com os anticorpos monoclonais

(Palivizumabe comercial e o fragmento Fab recombinante) foram avaliados e comparados entre si, quanto a sua capacidade em detectar a fase aguda da infecção pelo HRSV através dos imunoensaios, frente ao painel de amostras clínicas ou dos antígenos recombinantes (controles positivos), de forma a selecionar os potenciais alvos diagnósticos.

4.1 DESENVOLVIMENTO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES

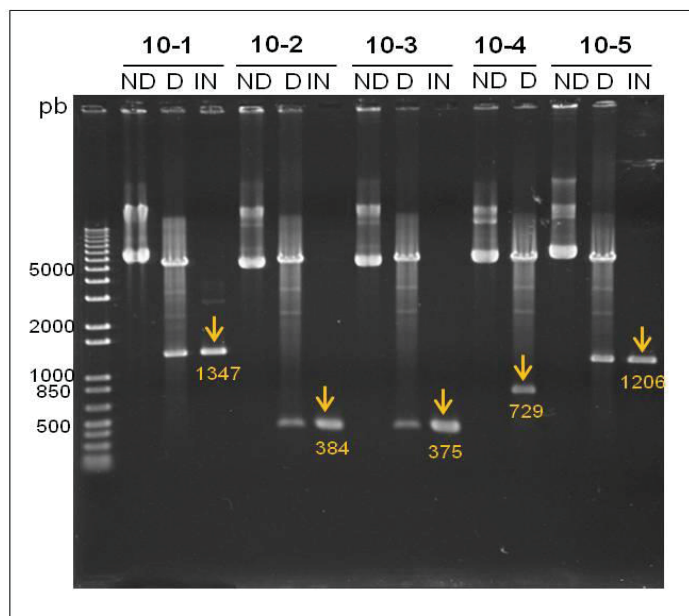
4.1.1 Construção dos vetores para expressão em *E. coli*

Foram realizadas, neste projeto, cinco construções para expressão dos antígenos do HRSV na cepa *BL21 DE3 star* de *E. coli* através do vetor pET28a. Estas construções consistem em 4 proteínas inteiras (N, F1, F2 e G) e um fragmento da proteína F1 (aa 412-524). As sequências gênicas codificantes destas proteínas foram obtidas no *Genbank* (TABELA 2) e sintetizadas no vetor pUC57, com sítios de restrições específicos para a subclonagem no vetor de expressão.

Todos os fragmentos de DNA correspondentes às sequências codificadoras destes antígenos foram inseridos com êxito no vetor de expressão pET28a, conforme pode ser verificado na FIGURA 12; após sua amplificação em bactéria e clivagens com as mesmas enzimas de restrição utilizadas na subclonagem, resultaram em banda única com o número de pares de bases esperado.

Após a análise do resultado do sequenciamento, foi constatado que as sequências nucleotídicas codificantes dos antígenos HRSV-F1, HRSV-F2, fragmento HRSV-F1 e HRSV-G apresentaram 100% de identidade com a sequência original (FIGURA 13, 14, 15 e 16). No caso do clone HRSV-N foi identificada a substituição de um nucleotídeo, que levou a substituição do aminoácido glutamato por lisina (FIGURA 17). Apesar de possuírem características diferentes, uma única substituição não deve impactar na estrutura e imunogenicidade da proteína.

FIGURA 12 – SUBCLONAGEM DOS ANTÍGENOS DE HRSV NO VETOR DE EXPRESSÃO
pET28A



Gel de agarose (0,7%), corado com brometo de etídio, mostrando a presença do inserto no plasmídio, assim como o seu tamanho adequado e integridade. M) Marcador 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen). ND: Plasmídios circulares, não digeridos. D: plasmídios digeridos com as enzimas de restrição *BamHI* e *HindIII*. IN: inserto clivado e isolado do plasmídio, através de eletroforese em gel de agarose.

FIGURA 13 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO 10-1
(HRSV-F1)

10-1 Cons :	GPIHSPLE*FCLTLRRRYTMGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQMGR	: 50
10-1 Clone :	-----E???	: 1
10-1 Cons :	GSLGFLLGVGSAIASGTAVSKVLHLEGEVKNKIKSALLSTNKAVVSLNSGV	: 101
10-1 Clone :	GSLGFLLGVGSAIASGTAVSKVLHLEGEVKNKIKSALLSTNKAVVSLNSGV	: 52
10-1 Cons :	VLTSKVLDLKNIYIDKQLLPFIVNKQSCRISNIETVIEFQQKNRRLLEITREF	: 152
10-1 Clone :	VLTSKVLDLKNIYIDKQLLPFIVNKQSCRISNIETVIEFQQKNRRLLEITREF	: 103
10-1 Cons :	SVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSI	: 203
10-1 Clone :	SVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSI	: 154
10-1 Cons :	MSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDR	: 254
10-1 Clone :	MSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDR	: 205
10-1 Cons :	GWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLFSEVNLCNVDFNPK	: 305
10-1 Clone :	GWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLFSEVNLCNVDFNPK	: 256
10-1 Cons :	YDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGNCDY	: 356
10-1 Clone :	YDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGNCDY	: 307
10-1 Cons :	ASNKGVDTVSVGNTLYVYNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASI	: 407
10-1 Clone :	ASNKGVDTVSVGNTLYVYNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASI	: 358
10-1 Cons :	SQVNEKINQSLAFIRKSDELLHHVNAGKSTTNIMITTIIIVIIIVLLSLIA	: 458
10-1 Clone :	SQVNEKINQSLAFIRKSDELLHHVNAGKSTTNIMITTIIIVIIIVLLSLIA	: 409
10-1 Cons :	VGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSNANS**KL	: 494
10-1 Clone :	VGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSNANS**KL	: 445

Cons) Sequência obtida através da análise do sequenciamento do DNA amplificado em *E. coli*. Clone) Sequência original desenhada para este antígeno. As sequências realçadas em preto correspondem ao antígeno. Em cinza estão as sequências do vetor preservadas pelo *software* (GeneDoc 2.7). Os asteriscos no final da sequência representam os dois códons de parada da tradução consecutivos (UAA).

FIGURA 14 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO 10-2 (HRSV-F2)

```

          *           20           *           40           *
10-2 Cons : *FCLTLRRRYTMGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQOMGRGSFASSQN : 50
10-2 Clone : -----P???GSFASSQN : 9
                      GSFASSQN

          60           *           80           *           100
10-2 Cons : ITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKL : 101
10-2 Clone : ITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKL : 60
              ITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKL

          *           120           *           140           *
10-2 Cons : IKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPAANNRARELPRFMNYTLNNTKKTNVTL : 152
10-2 Clone : IKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPAANNRARELPRFMNYTLNNTKKTNVTL : 111
              IKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPAANNRARELPRFMNYTLNNTKKTNVTL

          160
10-2 Cons : SKKRKRRFANS**KL- : 165
10-2 Clone : SKKRKRRFANS**KL- : 124
              SKKRKRRFANS KL

```

Cons) Sequência obtida através da análise do sequenciamento do DNA amplificado em *E. coli*. Clone) Sequência original desenhada para este antígeno. As sequências realçadas em preto correspondem ao antígeno. Em cinza estão as sequências do vetor preservadas pelo *software* (GeneDoc 2.7). Os asteriscos no final da sequência representam os dois códons de parada da tradução consecutivos (UAA).

FIGURA 15 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO 10-3 (FRAGMENTO DO HRSV-F1)

```

          *           20           *           40           *
10-3 Cons : *FCLTLRRRYTMGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQOMGRGSAIVSCY : 50
10-3 Clone : -----P???GSAIVSCY : 9
                      GSAIVSCY

          60           *           80           *           100
10-3 Cons : GKTCTASNKNRGI IKTFSNGCDYASNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLY : 101
10-3 Clone : GKTCTASNKNRGI IKTFSNGCDYASNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLY : 60
              GKTCTASNKNRGI IKTFSNGCDYASNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLY

          *           120           *           140           *
10-3 Cons : VKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHHVNAG : 152
10-3 Clone : VKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHHVNAG : 111
              VKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHHVNAG

          160
10-3 Cons : KSTTNANS**KL- : 162
10-3 Clone : KSTTNANS**KL- : 121
              KSTTNANS KL

```

Cons) Sequência obtida através da análise do sequenciamento do DNA amplificado em *E. coli*. Clone) Sequência original desenhada para este antígeno. As sequências realçadas em preto correspondem ao antígeno. Em cinza estão as sequências do vetor preservadas pelo *software* (GeneDoc 2.7). Os asteriscos no final da sequência representam os dois códons de parada da tradução consecutivos (UAA).

FIGURA 16 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO 10-4
(HRSV-G)

10-4_Cons	:	QFPF*	K*	FCLTLRRRYTMGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQ	Q	MGR	GSH	:	50
10-4_Clone	:	-----	-----	-----	P	???	GSH	:	4
							GSH		
		60	*	80	*	100			
10-4_Cons	:	KITSTTTIIQDATNQIKNTTPTYLTQNPQLGISPSNP	SDITSLITTILDSTT	:	102				
10-4_Clone	:	KITSTTTIIQDATNQIKNTTPTYLTQNPQLGISPSNP	SDITSLITTILDSTT	:	56				

Cons) Sequência obtida através da análise do sequenciamento do DNA amplificado em *E. coli*. Clone) Sequência original desenhada para este antígeno. As sequências realçadas em preto correspondem ao antígeno. Em cinza estão as sequências do vetor preservadas pelo *software* (GeneDoc 2.7). Os asteriscos no final da sequência representam os dois códons de parada da tradução consecutivos (UAA).

Uma vez tendo confirmado, através do sequenciamento, que os clones estavam com as sequências gênicas corretas, os mesmos foram utilizados para expressão das proteínas heterólogas do HRSV em *E. coli*.

FIGURA 17 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO 10-5
(HRSV-N)

10-5_Cons	:	E*	FCLTLRRRYTMGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQ	OMGR	GSALS	SKV	:	50
10-5_Clone	:	-----	P???	GSALS	SKV	:	8	
					GSALS	SKV		
10-5_Cons	:	60	*	80	*	100	:	101
10-5_Clone	:	KLNDTLNKDQLLSSSKYTIQRSTGDSIDTPNYDVQKHINKLCGMLLITEDA	:	59				
		KLNDTLNKDQLLSSSKYTIQRSTGDSIDTPNYDVQKHINKLCGMLLITEDA						
10-5_Cons	:	*	120	*	140	*	:	152
10-5_Clone	:	NHKFTGLIGMLYAMSRLGREDTIKILRDAGYHVKANGVDVTTHRQDINGKE	:	110				
		NHKFTGLIGMLYAMSRLGREDTIKILRDAGYHVKANGVDVTTHRQDINGKE						
10-5_Cons	:	160	*	180	*	200	:	203
10-5_Clone	:	MKFEVLTLASLTTK	IQINIEIESRKSYKKMLKEMGEVAPEYRHDSPDCGM	:	161			
		MKFEVLTLASLTT	IQINIEIESRKSYKKMLKEMGEVAPEYRHDSPDCGM					
10-5_Cons	:	*	220	*	240	*	:	254
10-5_Clone	:	ILCIAALVITKLAAGDRSGLTAVIRRANNVLKNEMKRYKGLLPKDIANSFY	:	212				
		ILCIAALVITKLAAGDRSGLTAVIRRANNVLKNEMKRYKGLLPKDIANSFY						
10-5_Cons	:	260	*	280	*	300	:	305
10-5_Clone	:	EVFEKHPHFIDVFVHFGIAQSSTRGGSRVEGIFAGLFMNAYGAGQVMLRWG	:	263				
		EVFEKHPHFIDVFVHFGIAQSSTRGGSRVEGIFAGLFMNAYGAGQVMLRWG						
10-5_Cons	:	*	320	*	340	*	:	356
10-5_Clone	:	VLAKSIKNIMLGHASVQAEMEQQVVEVYEAQKLGGEAGFYHILNPNKASLL	:	314				
		VLAKSIKNIMLGHASVQAEMEQQVVEVYEAQKLGGEAGFYHILNPNKASLL						
10-5_Cons	:	360	*	380	*	400	:	407
10-5_Clone	:	SLTQFPHFSSVVLGNAAGLGIMGEYRGTPRNQDLYDAAKAYAEQLKENGVI	:	365				
		SLTQFPHFSSVVLGNAAGLGIMGEYRGTPRNQDLYDAAKAYAEQLKENGVI						
10-5_Cons	:	*	420	*	440	:	440	
10-5_Clone	:	NYSVLDLTAEELAEIAIKHQLNPKDNDVELANS**KL	:	398				
		NYSVLDLTAEELAEIAIKHQLNPKDNDVELANS	KL					

Cons) Sequência obtida através da análise do sequenciamento do DNA amplificado em *E. coli*. Clone) Sequência original desenhada para este antígeno. As sequências realçadas em preto correspondem ao antígeno. A interrupção do realce em preto corresponde a troca dos aminoácidos (K por E). Em cinza estão as sequências do vetor preservadas pelo *software* (GeneDoc 2.7). Os asteriscos no final da sequência representam os dois códons de parada da tradução consecutivos (UAA).

4.1.2 Testes de expressão

Por ser um sistema simples e de baixo custo (HANNIG; MAKRIDES, 1998; JHAMB; SAHOO, 2012), cepas geneticamente modificadas de *E. coli* tem se tornado o sistema mais comum para o desenvolvimento de proteínas recombinantes (LEBENDIKER; DANIELI, 2014; ROSANO; CECCARELLI, 2014). Visando o

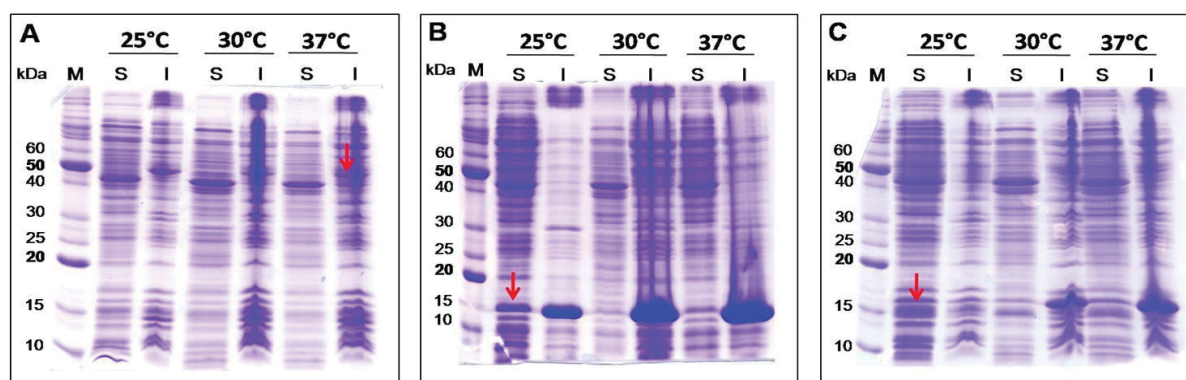
desenvolvimento de antígenos com baixo custo, focamos neste sistema de expressão, sejam estes obtidos de forma solúvel ou insolúvel.

A expressão de todos os antígenos do HRSV foi realizada na cepa *BL21Star* (DE3), de *E. coli*, que é uma das mais adequadas para o vetor pET28a, com expressão controlada pela indução com IPTG (INVITROGEN, 2010b). Porém, o maior problema deste sistema de expressão é a agregação de proteínas não enoveladas no citoplasma destas células, formando os corpos de inclusão insolúveis (JHAMB; SAHOO, 2012).

Para determinar a melhor condição de expressão, células da cepa *BL21Star* (DE3) competentes foram transformadas com cada clone e induzidas com IPTG em diferentes temperaturas. A temperatura de indução pode ter efeito no rendimento ou na solubilidade das proteínas heterólogas (VASINA; BANEYX, 1997; LEBENDIKER e DANIELI, 2014); em alguns casos, baixas temperaturas podem evitar a formação de corpos de inclusão (SINGH et al., 2015).

Após a coleta e análise das células, os extratos proteicos de cada condição foram analisados por SDS-PAGE (FIGURA 18A, 18B e 18C e 19A e 19B), para verificar os rendimentos da fração solúvel e insolúvel nas diferentes condições testadas.

FIGURA 18 – EFEITO DA TEMPERATURA NA SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO HRSV

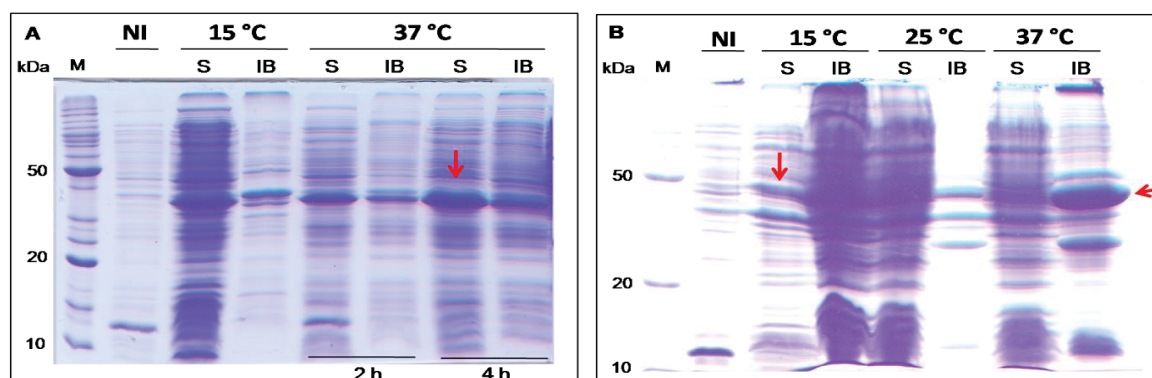


Géis de poliacrilamida 15% corados com *Comassie*. A) Proteína recombinante HRSV-F1. B) Proteína recombinante HRSV-F2. C) Fragmento recombinante da proteína HRSV-F1. M) Marcador. S) Fração solúvel do extrato de *E. coli* após a indução. I) Fração insolúvel do extrato de *E. coli* após a indução. Setas indicam a presença da proteína de interesse na melhor condição testada.

Através desta análise pode-se verificar que é possível a expressão de todos os antígenos de HRSV na cepa *BL21Star* (DE3) de *E. coli*, quando induzidas com

IPTG por 4 horas. Porém, as condições ótimas de expressão para cada antígeno variaram de acordo com a temperatura de indução, como mostrado na TABELA 10 e figuras 18 e 19.

FIGURA 19 – EFEITO DA TEMPERATURA NA SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO HRSV



Géis de poliacrilamida 15% corados com *Comassie*. A) Proteína recombinante HRSV-G. B) Proteína recombinante HRSV-N. M) Marcador. NI) Extrato de *E. coli* sem a presença do indutor, S) Fração solúvel do extrato de *E. coli* após a indução. IB) Fração insolúvel do extrato de *E. coli* após a indução. Setas indicam a presença da proteína de interesse na melhor condição testada.

TABELA 10 – MELHORES CONDIÇÕES PARA EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS DO HRSV EM *E. coli*

Antígeno	Expressão	
	T (°C)	Solubilidade
HRSV-F1	30	Insolúvel
HRSV-F2	15	Parcial
HRSV-F1 Frag	25	Parcial
HRSV-G	37	Solúvel
HRSV-N	25	Solúvel

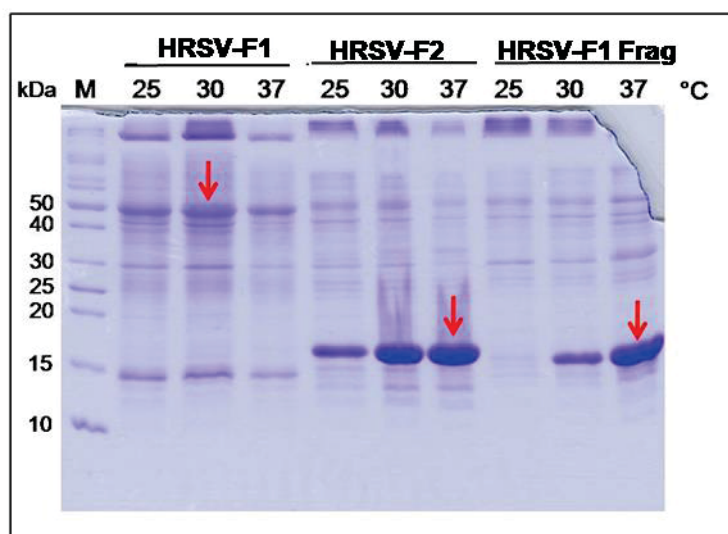
Em relação ao efeito da temperatura para as proteínas com maior tendência de expressão na fração insolúvel (HRSV-F1, HRSV-F2 e frag. HRSV-F1) pode-se observar que a 37°C há maior quantidade das três proteínas nesta fração (corpos de inclusão), quando comparadas as demais temperaturas testadas (Fig. 20). Em relação à proteína recombinante HRSV-F1, não foi possível detectar proteína de

interesse na fração solúvel. No entanto, pode-se observar sua expressão na fração insolúvel em todas as condições analisadas (FIGURA 18A e 20).

Com base nos resultados acima, pode-se afirmar que foi possível expressar todos os antígenos do HRSV em *E. coli*, apesar da literatura mostrar dificuldades na expressão destas proteínas inteiras em bactérias (BURAPHACHEEP; BRITT; SULLENDER, 1997; KOSAKA et al., 2004; BATONICK; WERTZ, 2011).

Os resultados encontrados aqui diferem daqueles descritos em literatura que mostram a expressão da proteína HRSV-G de forma insolúvel em *E. coli* (MURBY et al., 1995), assim como dos relatos da necessidade de coexpressão da proteína HRSV-N com a HRSV-P, para que seja obtida de forma solúvel (CURRAN; MARQ; KOLAKOFSKY, 1995; BHELLA et al., 2002; CASTAGNÉ et al., 2004; TRAN et al., 2007; ASENJO et al., 2012).

FIGURA 20 – EFEITO DA TEMPERATURA NA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO HRSV



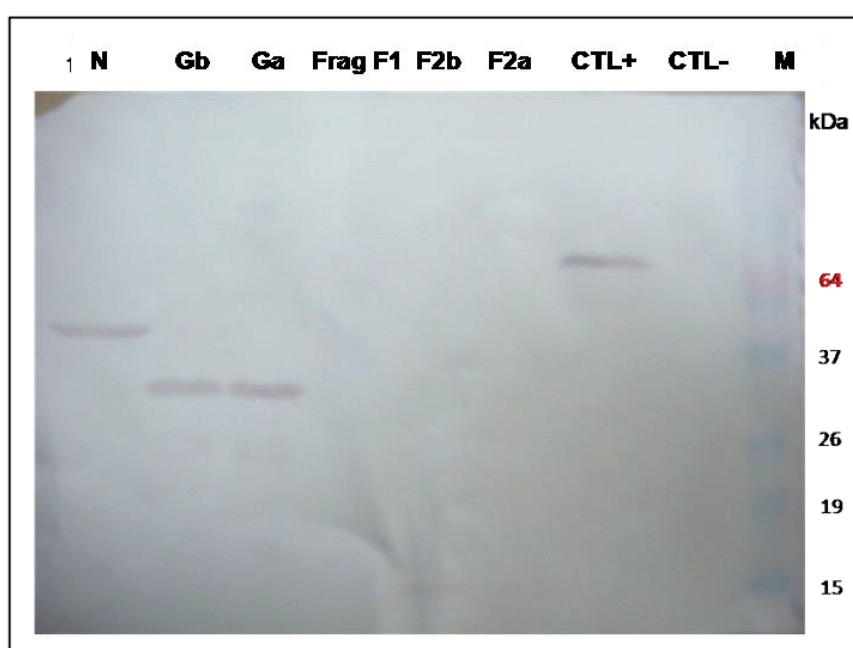
Análise das proteínas obtidas da fração insolúvel. Gel de poliacrilamida 15% corado com *Coomassie*. M) Marcador. Setas indicam a melhor condição para cada proteína.

A confirmação de que as bandas correspondentes no SDS-PAGE se tratam da proteína de interesse foi feita através de *Western blot* (FIGURA 21), utilizando anticorpos contra a etiqueta 6xHis e purificação do extrato de *E. coli* em resina de níquel. Com base nesses resultados foi possível confirmar (em ambos) a expressão na forma solúvel das proteínas HRSV-G e HRSV-N. A proteína HRSV-F2, apesar de

aparentar uma pequena quantidade solúvel em SDS-PAGE, não foi identificada pelo *Western blot* ou pelos testes de purificação.

Vários testes foram realizados na tentativa de expressar a proteína HRSV-F1 da fração solúvel em *E. coli* de acordo como descrito por Arcuri *et al.* (2008). Todavia, esses dados não foram reproduzidos em nosso laboratório. Devido a isso, para o propósito deste projeto usamos a HRSV-F1 solubilizada dos corpos de inclusão.

FIGURA 21 – CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS DO HRSV EM *E. coli*



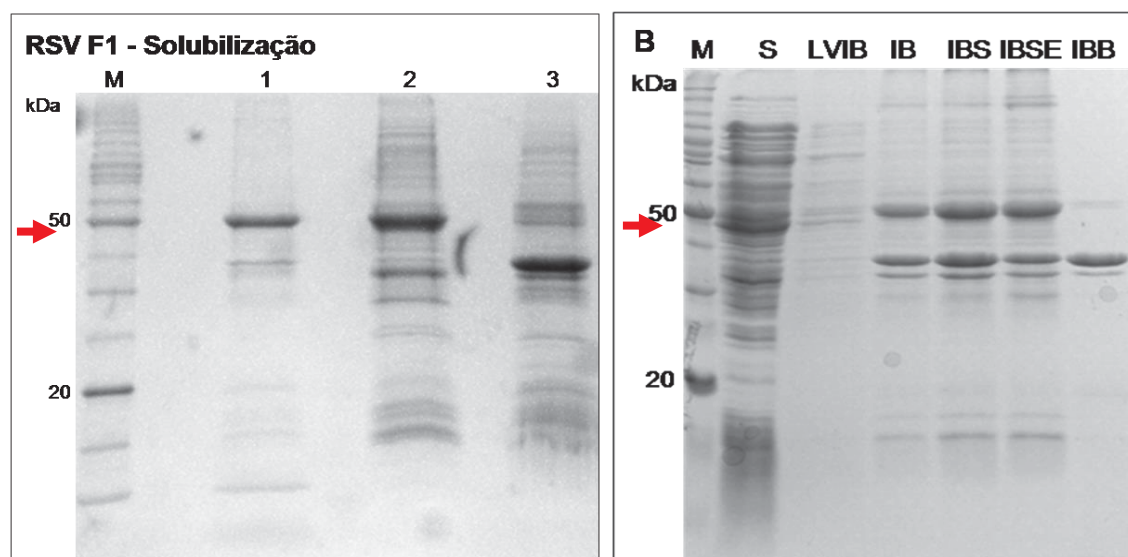
Análise através de *Western blot* da fração solúvel do extrato após a indução. N) Proteína do nucleocapsídeo (HRSV-N). G) Proteína de *attachment* (HRSV-G). Frag F1) Fragmento da subunidade 1 da proteína de Fusão (Frag. F1). F2) Subunidade 2 da proteína de Fusão (HRSV-F2). a, b) se referem a diferentes tampões de lise testados. CTL +) Controle positivo (proteína L fusionada a GFP), CTL -) controle negativo (extrato de *E. coli* em ausência do indutor).

Conforme mostram as FIGURAS 22 e 23, as subunidades 1 e 2 da proteína HRSV-F foram solubilizadas com êxito dos corpos de inclusão. Apesar do baixo rendimento, foi possível também a purificação por afinidade da proteína HRSV-F1 (conforme os resultados do item 4.1.3). A subunidade F1 por ser a proteína de maior importância patológica e imunogênica, é o principal alvo terapêutico e vacinal contra o HRSV. Por esta razão, os anticorpos terapêuticos Palivizumabe e Motavizumabe foram desenvolvidos contra esta proteína (WELLS *et al.*, 1994; BAWAGE *et al.*, 2013). Sendo, também, desta forma, ótimo alvo para o diagnóstico.

Houve muitas dificuldades em trabalhar com a proteína HRSV-F2 e com o fragmento da HRSV-F1 (Frag. F1) presentes na fração solúvel do extrato de *E. coli*. Nesta condição, não foi possível a purificação da HRSV-F2, mesmo sendo realizado vários testes para adequação do protocolo ou troca da etiqueta 6xHis da extremidade N-terminal para C-terminal. Por estes motivos, optou-se por não continuar trabalhando com essa proteína, visto que há relatos em literatura que além de ser pobre em epítomos, é onde está localizada a única região variável da proteína HRSV-F (JOHNSON; COLLINS, 1988); não sendo, desta forma, relevante ao diagnóstico.

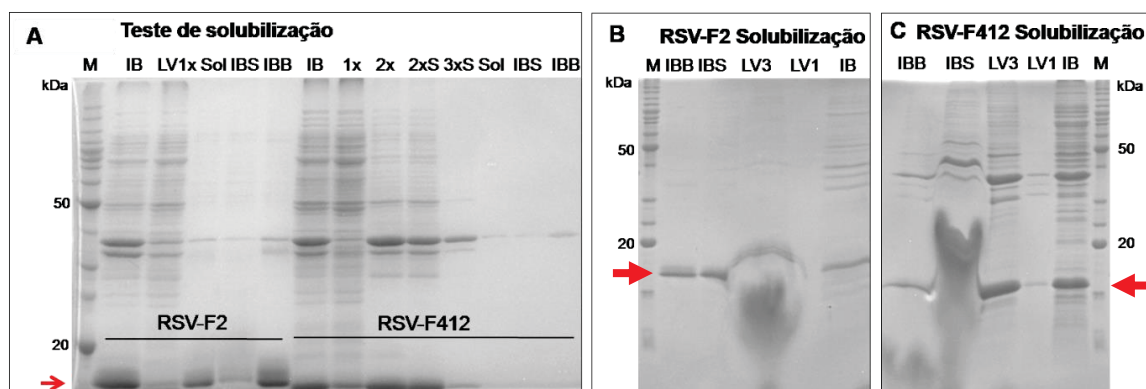
Já o frag. F1 da fração solúvel apresentou muita instabilidade ao longo dos testes de expressão e purificação. O vetor referente a esta proteína foi desenhado de modo a obtê-la de forma solúvel; como foi possível a obtenção da proteína HRSV-F1 inteira, através da solubilização dos corpos de inclusão, a obtenção do fragmento F1 não foi considerado relevante para as etapas posteriores. Porém, caso fossem necessários, tanto a HRSV-F2 quanto o frag. F1 também foram solubilizados com sucesso dos corpos de inclusão, como mostra a FIGURA 23A e B.

FIGURA 22 – SOLUBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA HRSV-F1 DOS CORPOS DE INCLUSÃO



Extrato provenientes de 2 L de cultivo de bactérias. Géis de poliacrilamida 15% corados com *Coomassie*. A) Testes de solubilização em diferentes pH. 1) Solubilização em pH alcalino. 2) Solubilização em pH neutro. 3) Solubilização em pH ácido. B) Teste de otimização da solubilização em pH alcalino. M) Marcador de peso molecular. S) Fração solúvel do extrato de *E. coli* após a indução. LVIB) Primeira lavagem dos corpos de inclusão, IB) Corpos de inclusão após três lavagens, IBS) Solubilização dos corpos de inclusão em pH alcalino (CAPS, pH 11) acrescido de detergente aniônico (1% de sarcosil), IBSE) Antígeno HRSV-F1 solubilizado dos corpos de inclusão, acrescido de sulfato de estreptomicina (1%). IBB) *Pellet* proveniente da solubilização. As setas indicam o peso molecular das proteínas de interesse.

FIGURA 23 – TESTES DE SOLUBILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS HRSV-F2 E FRAG. F1 DOS CORPOS DE INCLUSÃO DE *E. coli*



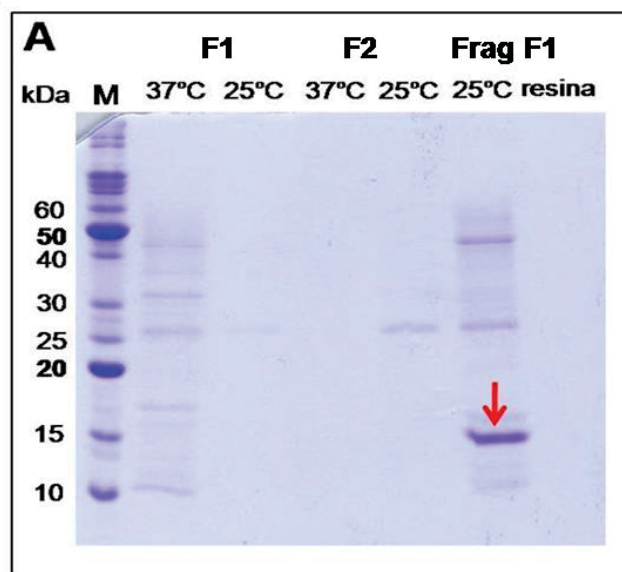
Géis de poliacrilamida 13 e 15% corados com *Coomassie*. M) Marcador de peso molecular (*Bench Marker*), IB) Fração insolúvel do extrato de *E. coli* após a indução. LV1x) Primeira lavagem dos corpos de inclusão. Sol) Fração solúvel do extrato de *E. coli* após a indução. IBS) Solubilização dos corpos de inclusão em pH alcalino (CAPS, pH 11) acrescido de detergente aniônico (1% de sarcosil). IBB) *Pellet* proveniente da solubilização. 1,2,3x) Corpos de inclusão solubilizado acrescido de diferentes concentrações de sulfato de estreptomicina (1, 2 e 3%, respectivamente). LV1,3) Lavagens 1 e 3 dos corpos de inclusão. RSV-F2) Subunidade 2 da proteína de fusão. RSV-F412) Fragmento da subunidade F1. A) Solubilização realizada no tampão inicial. B) Solubilização da HRSV-F2 realizada no tampão otimizado. C) Solubilização do fragmento da HRSV-F1 no tampão otimizado. As setas indicam as proteínas de interesse com o peso molecular esperado

4.1.3 Padronização das técnicas cromatográficas

Para purificar os antígenos do extrato bruto de *E. coli*, após a lise das células através de métodos químicos ou físicos e clarificação do extrato por centrifugação, foi feita a captura das proteínas recombinantes pela cromatografia de afinidade. Este tipo de cromatografia, por ser altamente específica, é a mais indicada para a purificação de proteínas recombinantes que possuem a etiqueta 6xHis, devido à alta quantidade de proteínas contaminantes presente no extrato. Nos casos em que após esta etapa de purificação ainda restaram contaminantes, foi utilizado um passo adicional de purificação, através da cromatografia de troca iônica, a fim de obter a proteína com alto grau de pureza.

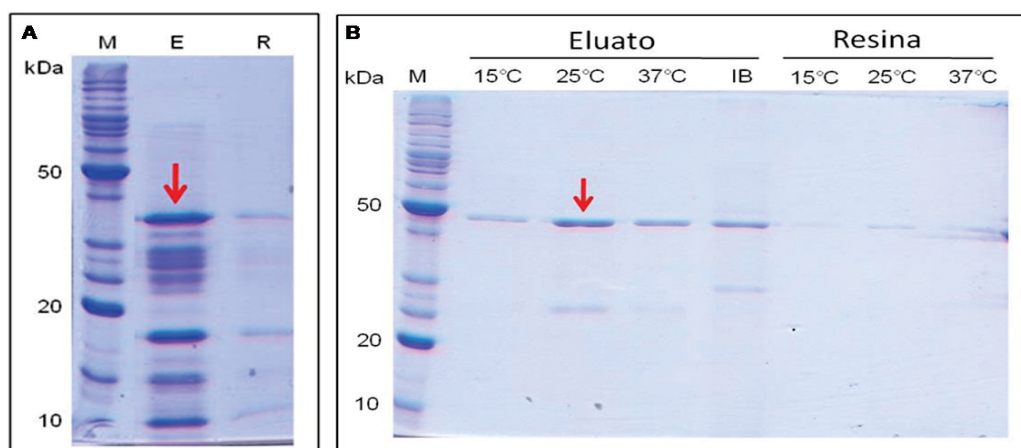
Após a determinação da melhor condição de expressão para cada antígeno, os extratos foram submetidos aos testes de purificação por afinidade com resina em suspensão, onde foram realizadas as adequações deste método para cada antígeno. A análise das alíquotas resultantes de cada fração da cromatografia, através do SDS-PAGE (FIGURA 24 e 25) mostrou a presença dos antígenos HRSV-F1, HRSV-G e HRSV-N com grau de pureza satisfatório para os objetivos aqui propostos.

FIGURA 24 – TESTES DE PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS DO HRSV



Cromatografia de afinidade utilizando a resina Ni-NTA realizada em bancada. Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie R-250. Teste de purificação da fração solúvel. F1) Subunidade 1 da proteína de fusão. F2) Subunidade 2 da proteína de fusão. Frag F1) Fragmento da subunidade 1 da proteína de fusão. Resina) Resina após as eluições com imidazol. 25 e 37°C) Se referem as diferentes temperaturas de indução das proteínas recombinantes. M) Marcador de peso molecular (*Bench Marker*). A seta indica a eluição da proteína de interesse com o peso molecular esperado.

FIGURA 25 – TESTES DE PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS HRSV-G E HRSV-N



Cromatografia de afinidade utilizando a resina Ni-NTA realizada em bancada. Géis de poliacrilamida 15% corados com azul de Coomassie R-250. A) Teste de purificação da fração solúvel da proteína HRSV-G. E) Eluição da proteína e R) Resina após a eluição. B) Teste de purificação fração solúvel da proteína HRSV-N em diferentes temperaturas de indução. Eluato) Frações correspondentes as eluições da proteína com o imidazol. Resina) Resina após as eluições. 15, 25 e 37°C) Diferentes temperaturas de indução. M) Marcador de peso molecular (*Bench Marker*). As setas indicam a eluição das proteínas de interesse com o peso molecular esperado.

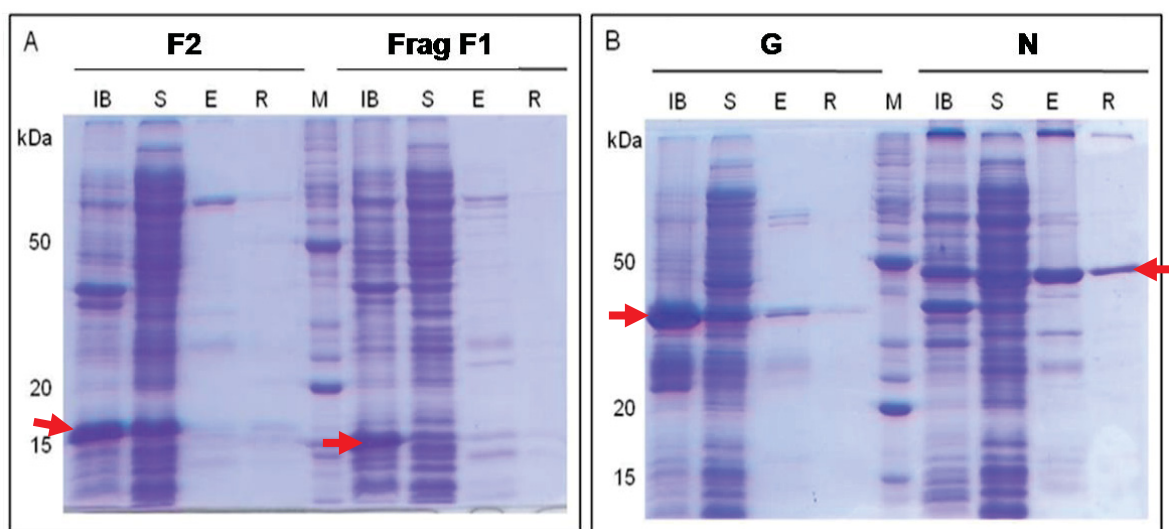
Através dos testes de purificação iniciais, os quais incluíram baixa concentração de imidazol no tampão de ligação (5 mM imidazol), tampões sem

detergentes e β -mercaptoetanol, diferentes pHs (6.8-11.0), constatou-se que as proteínas HRSV-F2 e HRSV-G apresentaram baixa afinidade pela resina de níquel, já que não estavam se ligando à resina Ni-NTA (FIGURA 26 e 27) de modo esperado, pois a maior parte destas proteínas estavam presentes nas frações anteriores à eluição.

No caso da proteína HRSV-G, a purificação somente foi possível após nova subclonagem (FIGURA 27), de modo que a etiqueta 6xHis se fusionasse na extremidade C-terminal desta proteína. Essa dificuldade na purificação pode estar relacionada aos diferentes níveis de solubilidade da proteína G (FIGURA 19A), dificultando sua interação com o níquel da coluna cromatográfica. Os diferentes níveis de solubilidade da proteína G, assim como o baixo desempenho na cromatografia por afinidade, também foram observados em outros sistemas de expressão (LEE et al., 2017). Já para a proteína HRSV-F2, não foi possível a purificação, mesmo com a cauda de histidina fusionada na extremidade C-terminal.

Em relação aos testes de cromatografia de afinidade da proteína HRSV-F1, apesar do baixo rendimento, foi possível a purificação desta proteína solubilizada dos corpos de inclusão, nos dois tampões testados (FIGURA 28), com rendimento semelhante. Em ambos pode se observar que uma grande quantidade da proteína não se ligou à resina. Este fato pode estar relacionado a interferência da ureia ou do detergente aniônico na afinidade da etiqueta 6xHis pelo níquel imobilizado na coluna cromatográfica (SCHLAGER; STRAESSLE; HAFEN, 2012).

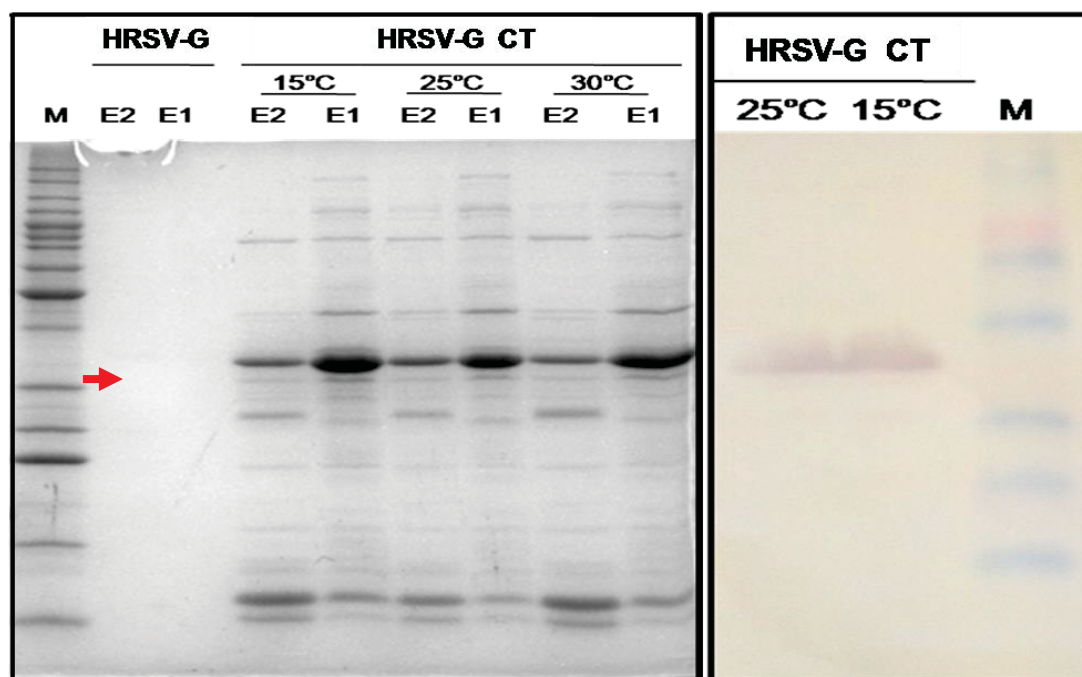
FIGURA 26 – TESTES DE PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS DO HRSV



Cromatografia de afinidade utilizando a resina Ni-NTA realizada em bancada. Géis de poliacrilamida 15% corados com azul de *Coomassie* R-250. A) Teste de purificação da fração solúvel das proteínas

HRSV-F2 (F2) e do fragmento HRSV-F1 (Frag F1). B) Teste de purificação da fração solúvel das proteínas HRSV-G (G) e HRSV-N (N). IB) Corpos de inclusão. S) Fração solúvel. E) Eluição e R) Resina após as eluições. M) Marcador de peso molecular (*Bench Marker*). As setas indicam as proteínas de interesse com o peso molecular esperado.

FIGURA 27 – TESTES DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HRSV-G COM A ETIQUETA 6XHIS FUSIONADA NA EXTREMIDADE C-TERMINAL

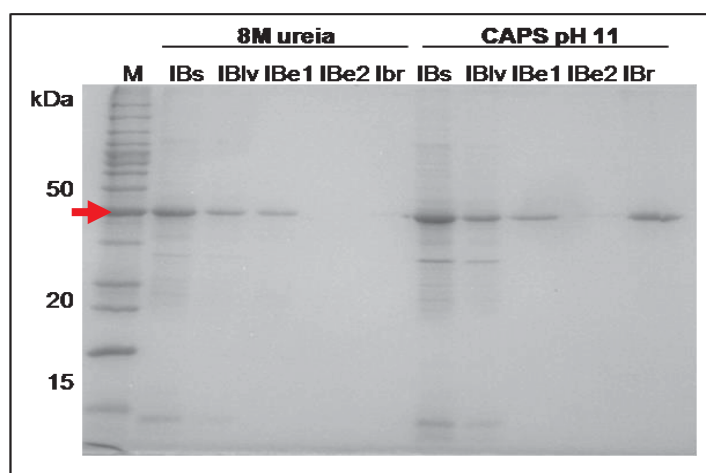


Cromatografia de afinidade utilizando a resina Ni-NTA realizada em bancada. Géis de poliacrilamida 15% corados com azul de *Coomassie* R-250. A) Teste de purificação da fração solúvel onde foram analisadas diferentes temperaturas de indução da expressão. HRSV-G) Purificação do antígeno G com a etiqueta de histidina fusionada na região N-terminal. HRSV-G CT) Testes de expressão e purificação do antígeno G com a etiqueta de histidina fusionada na região C-terminal. E1) Eluição da proteína de interesse com 0,5 M de imidazol. E2) Eluição da proteína de interesse em pH baixo (4.5). B) Ensaio de *Western blot* para confirmar a presença da etiqueta 6xHis da proteína G na purificação da fração solúvel, em duas diferentes temperaturas de indução da expressão, tendo a etiqueta 6xHis fusionada na extremidade C-terminal. M) Marcador de peso molecular (*Bench Marker*). A seta indica o peso molecular esperado da proteína de interesse

Em tampão alcalino, mesmo na concentração máxima do eluente imidazol, grande parte da proteína ainda permanece ligada na resina (FIGURA 28). Isso pode estar relacionado ao fato das moléculas proteicas estarem na forma reduzida, o que possibilita a ligação das cisteínas com o níquel; a força desta ligação é muito maior do que a da histidina (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009). A fim de contornar este problema, foram realizados também testes com resinas de troca catiônica e interação hidrofóbica, porém o perfil cromatográfico foi semelhante em todos os casos (FIGURA 29).

Apesar disso, a purificação da HRSV-F1 solubilizada em tampão alcalino foi escalonada para o cromatógrafo, porém, não foi utilizado o agente redutor. Evitamos o uso do protocolo com ureia, pois seu uso em grande quantidade, encarece o produto, além de interferir nos ensaios imunológicos. E ainda, quando são retiradas da solução contendo a proteína de interesse purificada, pode ocorrer precipitação (JHAMB; SAHOO, 2012). Já as proteínas provenientes da cromatografia em tampão alcalino, foram dialisadas em PBS, sem observar nenhuma precipitação e com rendimento semelhante aos verificados nos testes com as resinas em suspensão (FIGURAS 28 e 29).

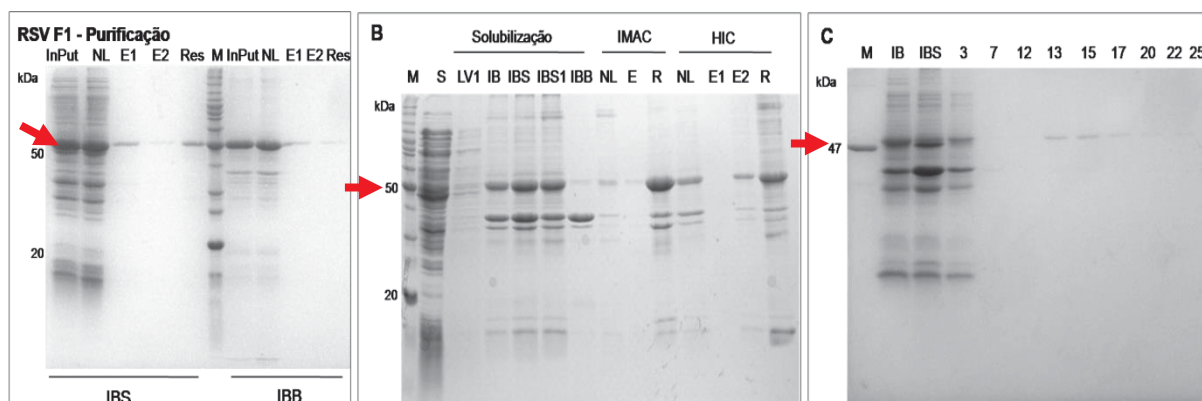
FIGURA 28 – TESTE DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HRSV-F1 SOLUBILIZADA DOS CORPOS DE INCLUSÃO



Comparação entre a solubilização em 8M ureia e a de pH alcalino acrescido de detergente aniônico. Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de *Coomassie* R-250. M) Marcador de peso molecular (*Page Rule*), IBs) Proteínas solubilizadas dos corpos de inclusão. IBlv) Primeira lavagem dos corpos de inclusão. IBe1) Eluição da proteína com imidazol. IBe2) Eluição da proteína em pH baixo(4.5). IBr) Resina após as duas eluições. A seta indica o peso molecular esperado da proteína de interesse.

Após estabelecidas as melhores condições para a purificação de cada antígeno através dos testes com resinas em suspensão e análise por SDS-PAGE, o mesmo protocolo foi adaptado para as purificações no cromatógrafo das proteínas HRSV-F1, HRSV-G e HRSV-N. Nesta etapa, as purificações foram realizadas com os extratos de *E. coli*, de cada antígeno, provenientes de 2 litros do meio de cultivo.

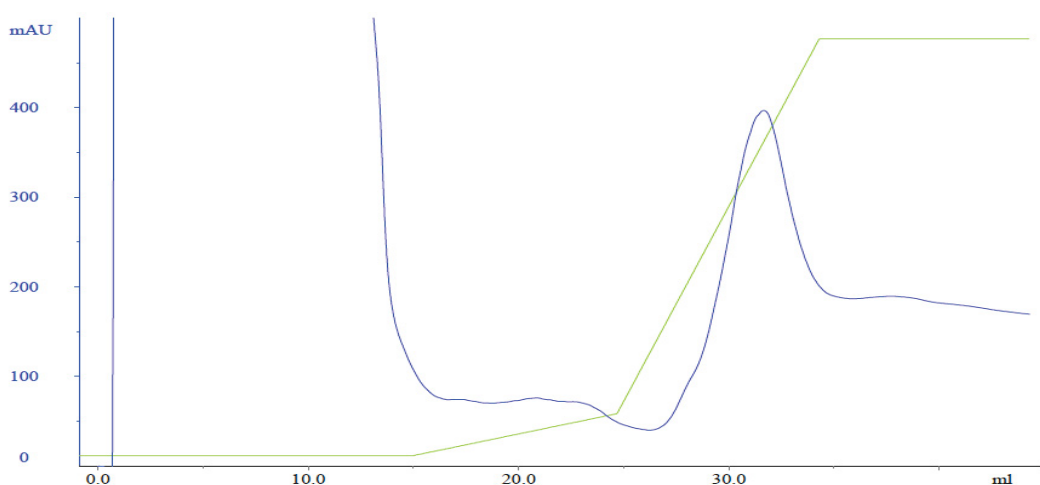
FIGURA 29 – TESTE DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HRSV-F1 SOLUBILIZADA DOS CORPOS DE INCLUSÃO



A proteína foi solubilizada em pH alcalino, acrescido de detergente aniônico. Géis de poliacrilamida 15% corados com azul de *Coomassie* R-250. A) Purificação com as resinas de troca aniônica e catiônica. B) Solubilização e purificação de afinidade e interação hidrofóbica. C) Purificação de afinidade no cromatógrafo. M) Marcador de peso molecular (*Page Rule*), NL) Fração das proteínas que não se ligaram a coluna; LV) Fração da lavagem; IBs) Proteínas dos corpos de inclusão solubilizados, E1) Eluição da proteína com 0,5 M do eluente imidazol, E2) Eluição da proteína em pH baixo (4,5), R) Resina após as duas eluições. 3-25) Diferentes frações coletadas ao longo da cromatografia no AKTA. As setas indicam o peso molecular esperado da proteína de interesse.

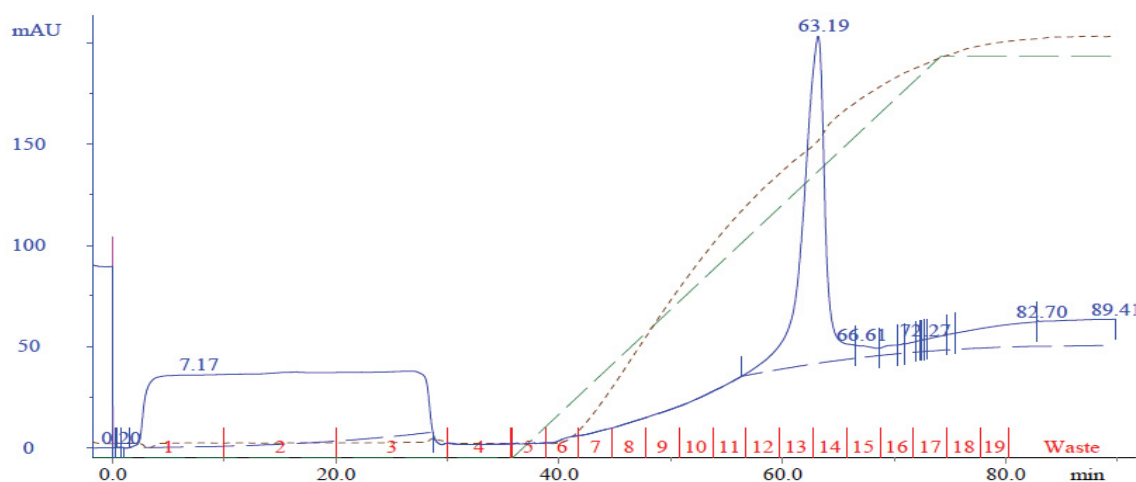
Os resultados foram analisados através dos cromatogramas gerados ao longo da cromatografia por afinidade (FIGURA 30) e troca iônica (FIGURA 31) e através da análise das frações destas cromatografias por SDS-PAGE (FIGURA 32, 33, 34 e 35). De um modo geral, os cromatogramas gerados em uma mesma etapa de purificação para diferentes proteínas são bem semelhantes entre si, por esta razão foram omitidos.

FIGURA 30 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PURIFICAÇÃO DE AFINIDADE



O cromatograma mostra a dinâmica da absorbância ao longo da purificação (linha azul) e o gradiente do tampão de eluição (linha verde).

FIGURA 31 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PURIFICAÇÃO DE TROCA IÔNICA



O cromatograma mostra a dinâmica da absorbância ao longo da purificação (linha azul). O gradiente do tampão de eluição (linha verde) e a condutividade (linha marrom). Em vermelho está identificada cada fração coletada ao longo da cromatografia.

Durante o preparo do extrato ou da corrida cromatográfica da proteína HRSV-N foi possível observar que poucos minutos após a lise bacteriana, ocorria a precipitação do extrato, mesmo acondicionado em gelo, interferindo no processo cromatográfico, devido ao entupimento da coluna. A mesma situação se repetiu em outras tentativas, mesmo com ajustes na composição dos tampões e troca da coluna de 1 mL por coluna de 5 mL (HisTrap HP 5 mL).

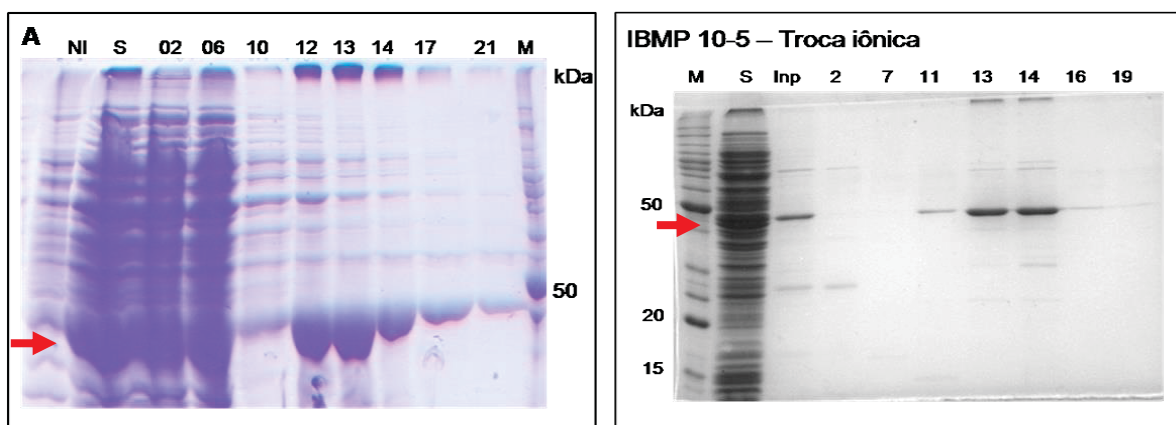
Após busca em literatura sobre as características físico-químicas desta proteína, descobriu-se que ela possui 2 sítios de ligação para RNA, e que logo após a lise, se interagia com o RNA de *E. coli*, formando uma estrutura semelhante ao nucleocapsídeo (CURRAN et al., 1995; BHELLA et al., 2002; CASTAGNE et al., 2004; TRAN et al., 2007; ASENJO et al., 2012), tal estrutura provavelmente possui tamanho superior aos poros da coluna, o que causava seu entupimento.

A purificação neste caso, somente foi possível com suplementação do extrato com RNase, sonicação e precipitação do RNA com sulfato de estreptomicina (1%); as frações mais puras foram reunidas e então diluídas em tampão adequado a cromatografia de troca iônica, conforme mostram as FIGURAS 32 e 33.

Comparando a purificação das FIGURAS 32 e 33 pode se observar uma grande diferença na qualidade da purificação tanto na afinidade (FIGURA 32A e 33A), quanto na troca iônica (FIGURA 32B e 33A). Esta diferença foi obtida com otimização da purificação testando diferentes aditivos no tampão (FIGURA 33B). Neste caso, nas duas etapas cromatográficas, foi adicionado 0.5% de deoxicolato e

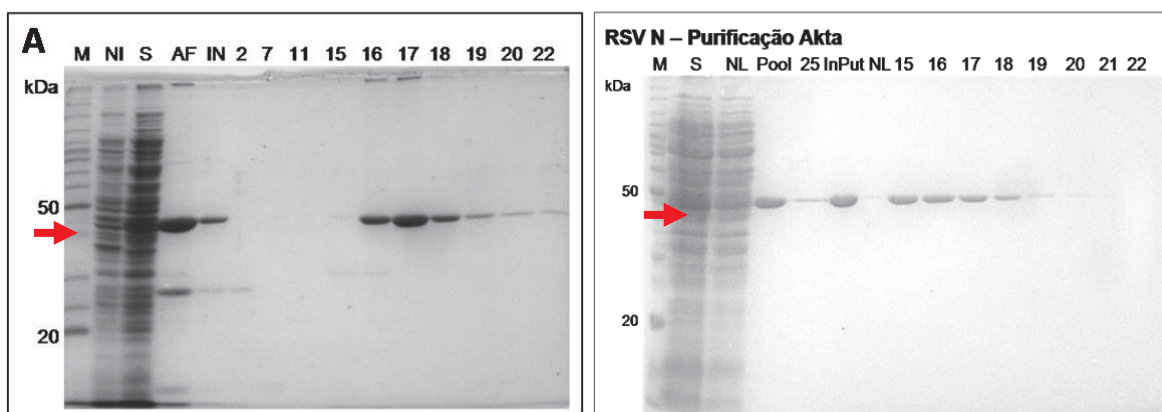
diminuído a concentração de NaCl no tampão inicial (tampão A), associado também com o aumento do volume de tampão nas lavagens da coluna, em relação ao primeiro teste. Conforme pode-se observar na figura 33b (Pool – *pool* da afinidade) em relação a 33a (AF – *pool* da afinidade), somente com a etapa de cromatografia de afinidade já foi possível obter alto grau de pureza da proteína HRSV-N.

FIGURA 32 – ETAPAS CROMATOGRÁFICAS DA PROTEÍNA HRSV-N NO SISTEMA AKTA



Análise das frações coletadas ao longo das purificações da fração solúvel do extrato de *E. coli*. Géis de poliácridamida 13 e 15% corados com azul de *Coomassie* R-250. A) Cromatografia de afinidade. NI) Não induzido, S) Fração solúvel, 2 e 6) Frações das proteínas não ligadas na coluna de níquel, 10) Fração referente ao segmento de lavagem da coluna para remoção das proteínas contaminantes, 12-21) Frações da eluição. B) Cromatografia de troca iônica. S) Fração solúvel, Inp) *Pool* das frações da eluição da cromatografia de afinidade diluída no tampão de ligação da cromatografia de troca iônica, 2) Fração referente as proteínas não ligadas na coluna, 7) Fração referente ao segmento de lavagem, 11- 16) Frações referentes a eluição da proteína de interesse, 19) Fração final da cromatografia, onde contém a concentração máxima do eluente. M) Marcador de peso molecular (*Bench Mark*). As setas indicam o peso molecular esperado das proteínas de interesse.

FIGURA 33 – CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DA PROTEÍNA HRSV-N



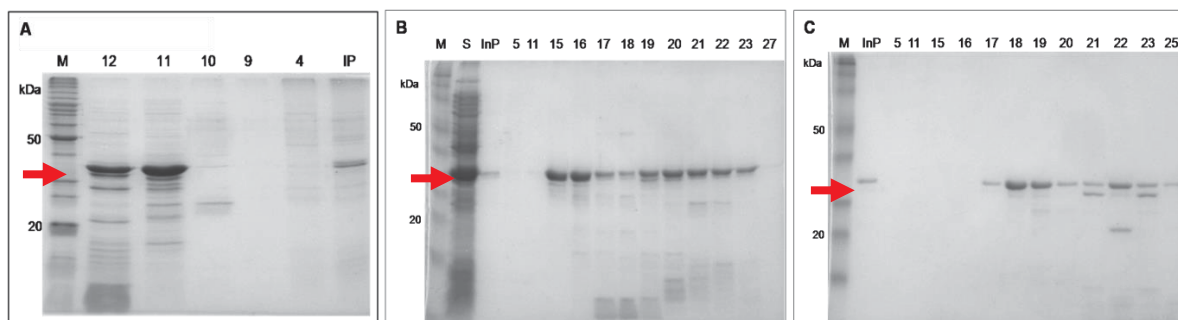
Análise das frações coletadas ao longo dos testes de otimizações da purificação no sistema AKTA. Géis de poliácridamida 13% corados com azul de *Coomassie* R-250. A) Cromatografia de troca iônica inicial. NI) Não induzido, S) Fração solúvel, AF) *Pool* da eluição da cromatografia de afinidade, IN) *Pool* diluído no tampão de ligação da cromatografia de troca iônica, 2 e 7) Frações das proteínas não

ligadas na coluna de troca catiônica, 11 e 15) Fração referente ao segmento de lavagem, 16-22) Frações da eluição. B) Cromatografia de troca iônica utilizando detergente desde a cromatografia de afinidade. *Pool* e *InPut* - *Pool* da eluição da cromatografia de afinidade, 15-19) Frações da eluição, 20-22) Fração final da cromatografia contendo a concentração máxima do eluente. M) Marcador de peso molecular (*Bench Mark*). As setas indicam o peso molecular esperado das proteínas de interesse.

No caso da proteína HRSV-G, com a adição do detergente deoxicolato no tampão da cromatografia de afinidade, foi possível observar uma redução dos contaminantes desta etapa, consequentemente, houve melhora também na cromatografia de troca iônica (FIGURA 34B e 34C). Porém, resultados ainda melhores foram obtidos pela troca do tampão Tris-HCl pH 7.5, 0.3 M NaCl, 1% Tween-20 (FIGURA 34A) pelo tampão carbonato/bicarbonato pH 9.2, 0.5 M NaCl, 0.5% deoxicolato, onde aumentou ainda mais a pureza desta proteína na etapa de troca iônica (FIGURA 34C) em relação ao uso do tampão anterior (FIGURA 34B).

Observamos que a utilização do detergente deoxicolato aliado ao aumento do CV de tampão durante o segmento de lavagem tem auxiliado a remoção de contaminantes na cromatografia de afinidade. Estas otimizações se tornam de extrema relevância, pois com a eliminação da segunda etapa cromatográfica, o rendimento da proteína é muito superior. A economia de reagentes e o menor tempo de trabalho reduzem o custo final destes insumos.

FIGURA 34 – ETAPAS CROMATOGRÁFICAS DA PROTEÍNA HRSV-G NO SISTEMA AKTA

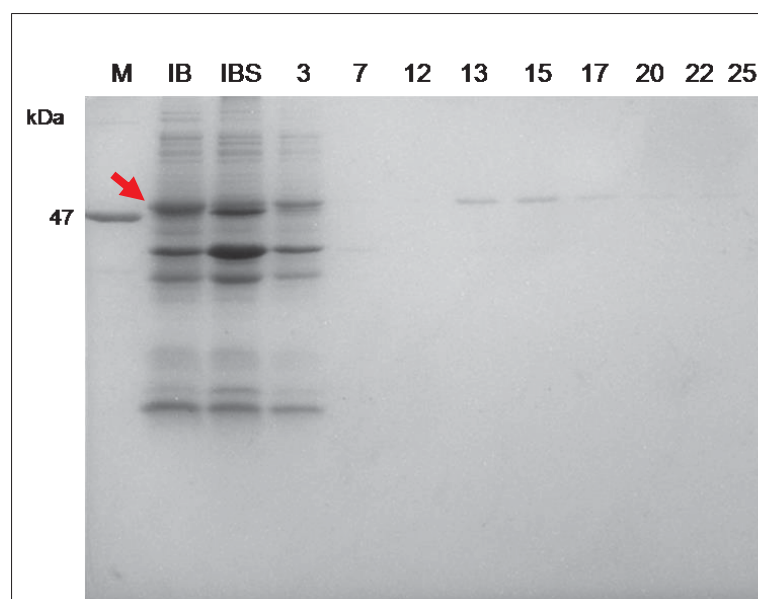


Análise das frações coletadas ao longo dos testes para otimização da purificação. Géis de poli-acrilamida 15% corados com azul de *coomassie* R-250. A) Cromatografia de Afinidade. IP) Extrato solúvel de *E. coli* diluído no tampão de ligação. 4) Fração referente as proteínas não ligadas na coluna, 9,10) Frações referentes ao gradiente de lavagem da coluna a fim de remover as proteínas contaminantes. 11,12) Frações correspondente a eluição da proteína de interesse. B e C) Cromatografia de Troca iônica. Frações coletadas das cromatografias sem e com detergente (respectivamente). M) Marcador de peso molecular (*Bench Mark*). As setas indicam o peso molecular esperado das proteínas de interesse.

Na FIGURA 35 pode verificar que a maior parte da proteína HRSV-F1 solubilizada dos corpos de inclusão, não se ligou à coluna, acarretando no baixo

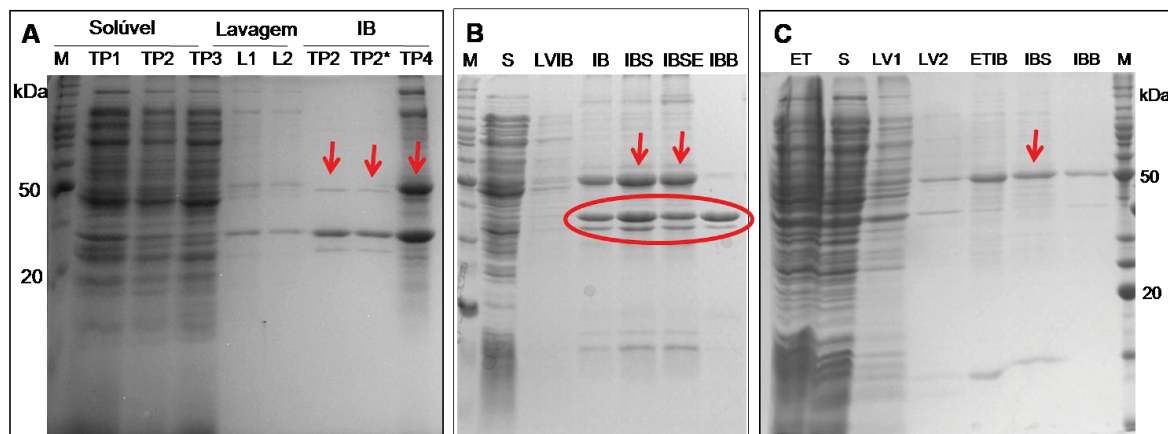
rendimento da proteína purificada. Com isso, dificultou-se a análise do grau de pureza desta proteína através do SDS-PAGE, já que os contaminantes podem estar presentes em quantidades aquém do detectável por este método. Resultados semelhantes em relação ao baixo desempenho na cromatografia de afinidade de proteínas do HRSV solubilizadas dos corpos de inclusão, em relação a baixa afinidade pelo metal imobilizado na coluna e a presença de impurezas, também são relatados em literatura (LEE et al., 2017). Com base nestas limitações, optou-se por testar diferentes tipos de aditivos e condições nos tampões, desde a lise até as etapas finais de solubilização, de forma a solubilizar o máximo de proteínas contaminantes já durante a lise e nas etapas posteriores de lavagens dos corpos de inclusão (FIGURA 36A e B), de modo que na etapa de solubilização reste apenas uma quantidade mínima de contaminantes (FIGURA 36C). O protocolo padronizado deste procedimento de solubilização está no ANEXO 1.

FIGURA 35 – CROMATOGRAPHIA DE AFINIDADE DA PROTEÍNA HRSV-F1 SOLUBILIZADA DOS CORPOS DE INCLUSÃO



Análise das frações coletadas ao longo da purificação no sistema AKTA. Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de *coomassie* R-250. M) Marcador de peso molecular (*Bench Mark*). IB) Corpos de inclusão, IBS) Corpos de inclusão solubilizado em pH alcalino acrescido de detergente aniônico (1% de sarcosil), 3) Frações das proteínas não ligadas na coluna da cromatografia de afinidade, 7 e 12) Fração referente ao segmento de lavagem, 13-20) Frações referentes a eluição, 22 e 25) Frações finais da cromatografia, contendo a concentração máxima do eluente. A seta indica o peso molecular esperado das proteínas de interesse.

FIGURA 36 – TESTES DE SOLUBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA HRSV-F1



A) Teste inicial de solubilização em tampão sem a presença de detergentes. Solúvel) Sobrenadante da lise. Lavagem) Sobrenadante obtido ao longo das lavagens dos corpos de inclusão. IB) Corpos de inclusão após as lavagens. TP1-4) Diferentes composições de tampões utilizados na otimização do protocolo de solubilização das proteínas dos corpos de inclusão de *E. coli*. L1 e L2) Diferentes tampões de lavagem dos corpos de inclusão. B) Segundo teste de solubilização, utilizando detergentes, porém em presença de sal. S) Sobrenadante obtido após a lise bacteriana. LVIB) Sobrenadante da lavagem dos corpos de inclusão. IB) Corpos de inclusão após as lavagens. IBS) Sobrenadante obtido após a solubilização da proteína dos corpos de inclusão. IBSE) Sobrenadante obtido após a solubilização da proteína dos corpos de inclusão, acrescido de sulfato de estreptomicina. IBB) Precipitado obtido após a solubilização da proteína dos corpos de inclusão. C) Teste final, onde foi otimizado desde a etapa de lise até a etapa de solubilização, utilizando pH alcalino em todas as etapas, glicerol em ausência de sal e utilização de detergentes aniônicos durante a solubilização. LV1-2) Diferentes tampões de lavagem dos corpos de inclusão. ETIB) Corpos de inclusão após as lavagens. IBS) Sobrenadante obtido após a solubilização da proteína dos corpos de inclusão. IBB) Precipitado obtido após a solubilização da proteína dos corpos de inclusão. As setas vermelhas ao longo das figuras mostram a otimização em relação a pureza e rendimento. O círculo destaca a principal proteína contaminante dos corpos de inclusão de *E. coli* eliminada com a otimização deste protocolo.

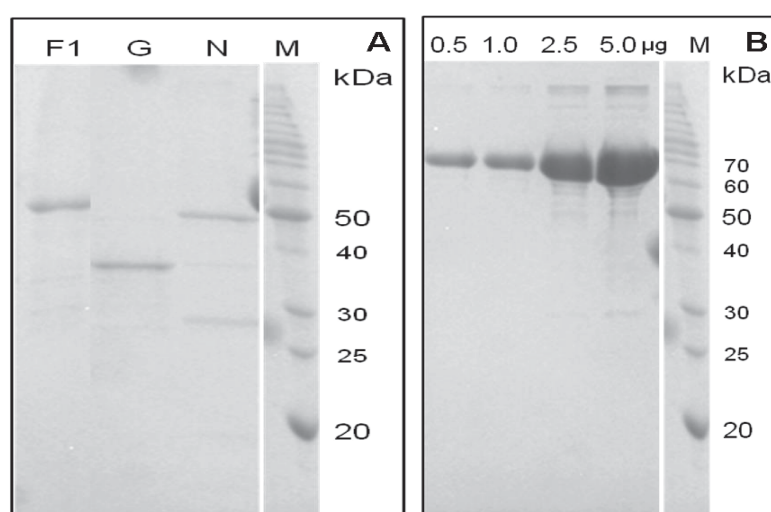
Após a padronização da purificação, os antígenos foram dialisados em PBS e suas massas foram quantificadas pelo fluorímetro *Qubit* e também pelo SDS-PAGE, com base em curva padrão com diferentes concentrações conhecidas da proteína comercial BSA (FIGURA 37B). A massa estimada para cada antígeno está apresentada na TABELA 11. Após a determinação de suas massas, os antígenos foram concentrados para 0,2 mg/mL (FIGURA 37A), permitindo assim, imunizar os camundongos de forma a não ultrapassar o volume máximo de amostra para inoculação em cada animal, conforme recomendado pelo Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA).

TABELA 11 – RENDIMENTO DOS ANTÍGENOS DO HRSV OBTIDOS EM *E. coli*

Antígenos	Expressão	Condições	Etapas purificação	Rendimento	
				mg/mL	*Total (mg)
HRSV-F1	Corpos inclusão	30°C – 03h	AF	0,16	1,2
HRSV-G	Solúvel	15°C – 16h	AF/TI	0,3	2,0
HRSV-N	Solúvel	25°C – 04h	AF/TI	0,55	3,3

* Se refere a quantidade total de proteína obtida da indução proveniente de 2L de meio de cultivo

FIGURA 37 – QUANTIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS



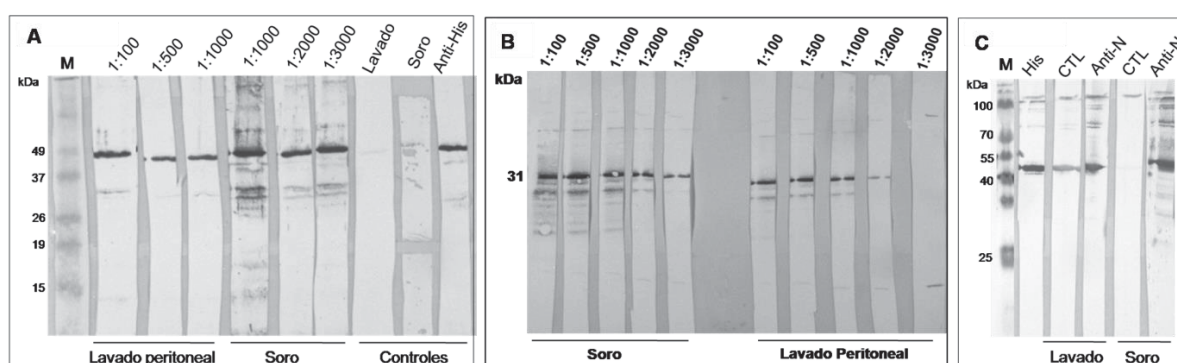
Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de *Coomassie* R-250. A) Antígenos recombinantes do HRSV após diálise em tampão de armazenamento. Foram aplicados 5 µL de cada antígeno por canaleta. F1) Subunidade 1 da proteína de fusão do envelope viral. G) Glicoproteína *attachment* do envelope viral. N) Proteína do nucleocapsídeo viral. B) Curva de BSA de massa conhecida, para quantificação dos antígenos, por comparação. Sendo aplicado 0,5; 1; 2,5; 5 µg de proteína, respectivamente, por canaleta. M) Marcador de peso molecular *Bench marker* (*Thermo Fisher*).

4.2 ANÁLISE E PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS

A fim de transferir os antígenos recombinantes obtidos em *E. coli* às condições adequadas para imunizar os camundongos, condições estas pré-determinadas pelo comitê de bioética animal, foram realizadas diálises destas proteínas somente em PBS. As proteínas se encontravam no tampão de eluição da cromatografia de troca iônica, que continham vários aditivos, os quais podem causar desconforto ou toxicidade aos animais ou ainda gerar anticorpos inespecíficos (CLARK et al., 2002).

Através dos ensaios de *Western blot* foi possível verificar a presença de anticorpos contra cada um dos antígenos do HRSV no soro e no lavado peritoneal dos camundongos, após as cinco imunizações. Constatamos que os anticorpos produzidos foram capazes de reagir especificamente com os antígenos virais em todas as diluições testadas (FIGURA 38). A FIGURA 39 corrobora com estes resultados, pois apresenta a análise do soro pré-imune de cada animal, onde foi possível constatar que mesmo este ensaio tendo sido realizado com o soro concentrado (1:100), não apresentou nenhuma reatividade; o que indica que estes animais não possuíam quaisquer anticorpos contra o HRSV antes das imunizações.

FIGURA 38 – CONFIRMAÇÃO DA OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS



Ensaio de *Western blot* realizado com diferentes concentrações (diluições) do soro e lavado peritoneal dos camundongos imunizados com os antígenos do HRSV. A) Imunização com o antígeno HRSV-F1. B) Imunização com o antígeno HRSV-G. C) Imunização com o antígeno HRSV-N. Controle positivo: anti-His. Controle negativo: camundongos imunizados com PBS em ausência de antígenos.

FIGURA 39 – ANÁLISE DA OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS

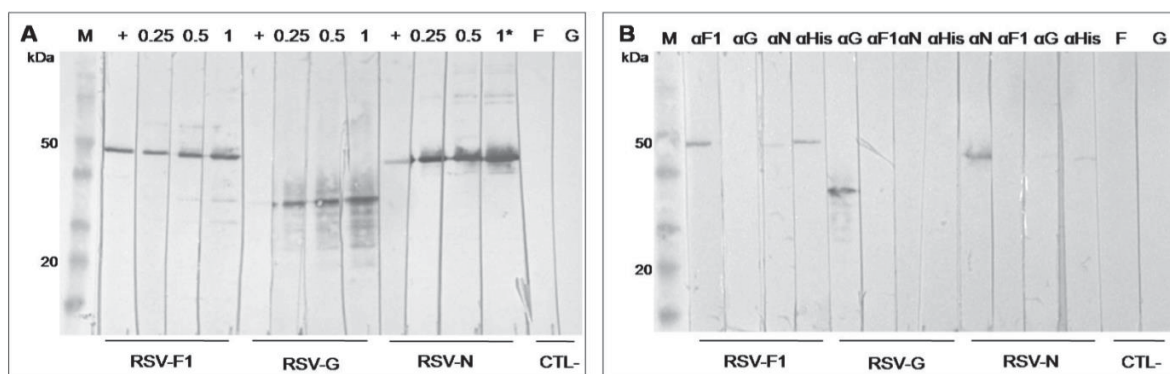


Ensaio de *Western blot* realizados com o soro dos camundongos antes das imunizações, a fim de confirmar a inexistência de anticorpos específicos para o HRSV no organismo destes animais. His) Controle positivo da reação. M) Marcador de peso molecular pré-corado (*Bench Mark*).

Para os ensaios de *Western blot* foi utilizada uma diluição de trabalho de 1:3000 para o soro e de 1:2000 para o lavado peritoneal. Por este motivo pode se considerar um ótimo rendimento, já que foi possível obter 7,5 mL de soro e 40 mL do lavado peritoneal, levando em conta os 15 animais utilizados. Ao longo do período de imunização não foi constatado nenhum comportamento anormal nos animais, somente alguns abscessos na região do inóculo, fato já esperado.

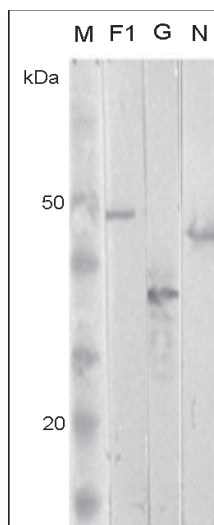
De modo geral, estes resultados demonstraram que os antissoros produzidos em camundongos, foram capazes de reconhecer de forma específica os seus respectivos antígenos. Quando incubados com outros antígenos do HRSV não houve reação na membrana de nitrocelulose do *Western blot* (FIGURA 40B). Além disso, quando foram incubados com diferentes concentrações de antígenos, apresentaram o mesmo desempenho em todas as concentrações testadas (250, 500 e 1000 ng) (FIGURA 40A), exceto para os anticorpos do lavado peritoneal, que se mostraram inespecíficos (FIGURA 41).

FIGURA 40 – ANÁLISE DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS



Ensaio de *Western blot* realizado com diferentes concentrações de antígenos (A) ou incubando os antígenos com os diferentes anticorpos policlonais do HRSV (B). CTL-) Controle negativo (camundongo imunizado com PSB em ausência do antígeno. anti-his) Controle positivo da reação. M) Marcador de peso molecular pré-corado (*Bench Mark*).

FIGURA 41 – ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS DO LAVADO PERITONEAL



Ensaio de *Western blot* utilizando anticorpos policlonais presentes no lavado peritoneal dos camundongos imunizados com os antígenos do HRSV. F1) Subunidade 1 da proteína de fusão do HRSV. G) Glicoproteína *attachment* do HRSV. N) Proteína do nucleocapsídeo do HRSV. M) Marcador de peso molecular pré-corado (*Bench Mark*). O lavado peritoneal foi diluído 1:2000.

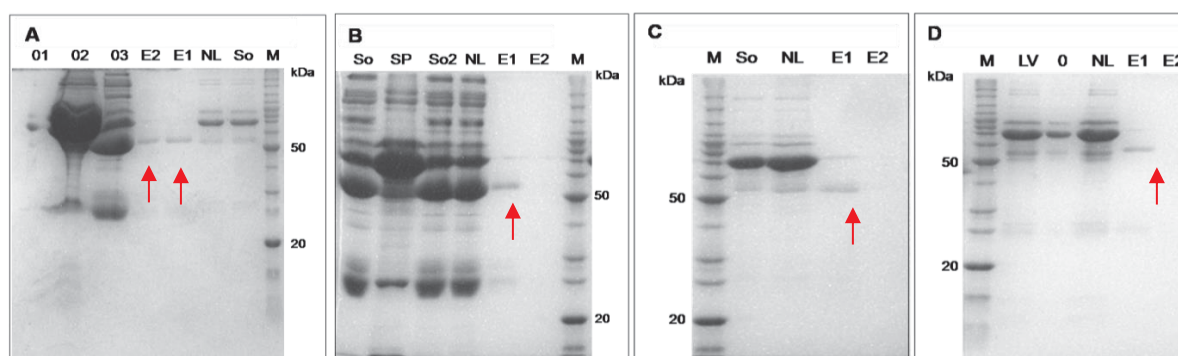
Foram realizadas várias tentativas de purificação dos anticorpos policlonais do soro dos camundongos, objetivando melhor desempenho destas moléculas nos imunoensaios. Através da precipitação dos anticorpos do soro, com o sulfato de amônio, foi possível remover a maior parte da albumina (FIGURA 42A), principal proteína contaminante do soro.

A FIGURA 42 mostra a purificação dos anticorpos precipitado do soro, utilizando microesferas magnéticas acopladas a proteína G. Pode ser observado que foi possível a purificação com pureza satisfatória, porém, com rendimento extremamente baixo; o que pode ser observado ao comparar as frações da eluição com aquela que não se ligou a resina cromatográfica (FIGURA 42B e C). Esse fato pode estar relacionado a proteína G não ser a molécula de captura mais adequada aos diferentes isotipos de IgG de camundongo (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 2002), aliado a utilização de baixa proporção de resina para a massa de anticorpos purificados. Como a quantidade de soro é limitada e uma nova aquisição requer tempo e sacrifício de outros animais, optou-se por não purificar os anticorpos policlonais do soro.

A fim de avaliar possíveis reações não específicas do soro nos imunoensaios, foi utilizado o soro de animais que receberam a imunização somente

com PBS e adjuvante, como controles negativos. Em contrapartida, anticorpos presentes no lavado peritoneal possuem poucos contaminantes (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 2002), sendo possível atingir alto grau de pureza somente pela precipitação com o sulfato de amônio, eliminando a etapa de purificação. Entretanto, por não apresentarem bom desempenho nos testes de especificidade (FIGURA 41), não foram utilizados nos ensaios.

FIGURA 42 – TESTES DE PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-HRSV



Ensaio realizado com os anticorpos presentes no soro dos camundongos através de microesferas magnéticas acopladas a proteína G. Géis de poliacrilamida 13% corados com azul de *Coomassie* R-250. A) Purificação do anticorpo anti-HRSVF1; B) Purificação do anticorpo anti-HRSVG; C) Purificação do anticorpo anti-HRSVN; D) Purificação do anticorpo do lavado peritoneal anti-HRSVG. 01-03) Diferentes diluições do soro. NL) Não ligado. E1) Primeira eluição. E2) Segunda eluição. So) Precipitado do soro. SP) Sobrenadante da precipitação. M) Marcador de peso molecular pré-corado (*Bench Mark*). As setas indicam a eluição dos anticorpos que foram purificados do soro.

4.3 DESENVOLVIMENTO DOS ANTICORPOS RECOMBINANTES

Os anticorpos vêm sendo cada vez mais utilizados, tanto na pesquisa, quanto no diagnóstico e terapia, aumentando com isso, significativamente, a demanda na quantidade destas moléculas. Com isso surgiu a necessidade de aperfeiçoamento e desenvolvimento de novos sistemas de produção (FORSSTRÖM et al., 2015; FRENZEL; HUST; SCHIRRMANN, 2013).

A produção de mAb pela tecnologia do hibridoma foi um marco significativo na geração dos anticorpos para uso terapêutico (FRENZEL; HUST; SCHIRRMANN, 2013). Porém, por ser de origem murina, muitos destes mAbs provocavam uma resposta imune indesejada nos pacientes, o que levou ao surgimento dos mAbs humanizados, desenvolvidos a partir da tecnologia dos anticorpos recombinantes (KARU; BELL; CHIN, 1995). Esta técnica consiste na obtenção de anticorpos

monoclonais *in vitro* através de genes sintéticos (BIRCH; RACHER, 2006). Uma das primeiras abordagens envolveu a união das CDR (regiões determinantes da complementariedade) das regiões variáveis do anticorpo murino com a estrutura do anticorpo humano (KARU; BELL; CHIN, 1995). Com isso, foi possível a produção de anticorpos difíceis ou impossíveis de obter a partir de animais (KARU; BELL; CHIN, 1995).

Com base nesta abordagem, foi possível também, o desenvolvimento de fragmentos do mAb humanizado, para os casos em que somente a região Fab é suficiente para o efeito desejado, incluindo aplicações terapêuticas e diagnósticas. Estes fragmentos são produzidos mais facilmente, e possuem a mesma capacidade de ligação e estabilidade que a molécula do mAb intacta (FRENZEL; HUST; SCHIRRMANN, 2013). O fragmento Fab pode ser obtido de modo natural, através da clivagem dos mAbs com a enzima papaína, ou através da expressão de genes sintéticos (KARU; BELL; CHIN, 1995).

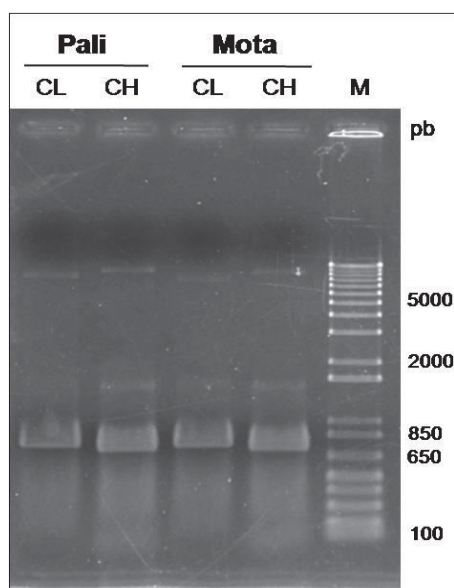
Levando em conta o alto custo para obtenção dos mAbs recombinantes intactos, em células de mamíferos ou de insetos, para fins diagnósticos, se torna mais vantajoso produzir o fragmento Fab de forma recombinante (HOLLIGER; HUDSON, 2005), em levedura (DOERNER et al., 2014; LANGE; SCHMITT; SCHMID, 2001).

4.3.1 Obtenção dos vetores para expressão em Levedura

As sequências codificantes dos fragmentos Fabs utilizadas na obtenção dos vetores de expressão foram obtidas através de PCR, tendo os genes sintéticos do Palivizumabe e Motavizumabe como *template*. Conforme mostra a FIGURA 43, foi possível a amplificação dos insertos referentes as cadeias leves e pesadas do Fab para os dois anticorpos (Palivizumabe e Motavizumabe).

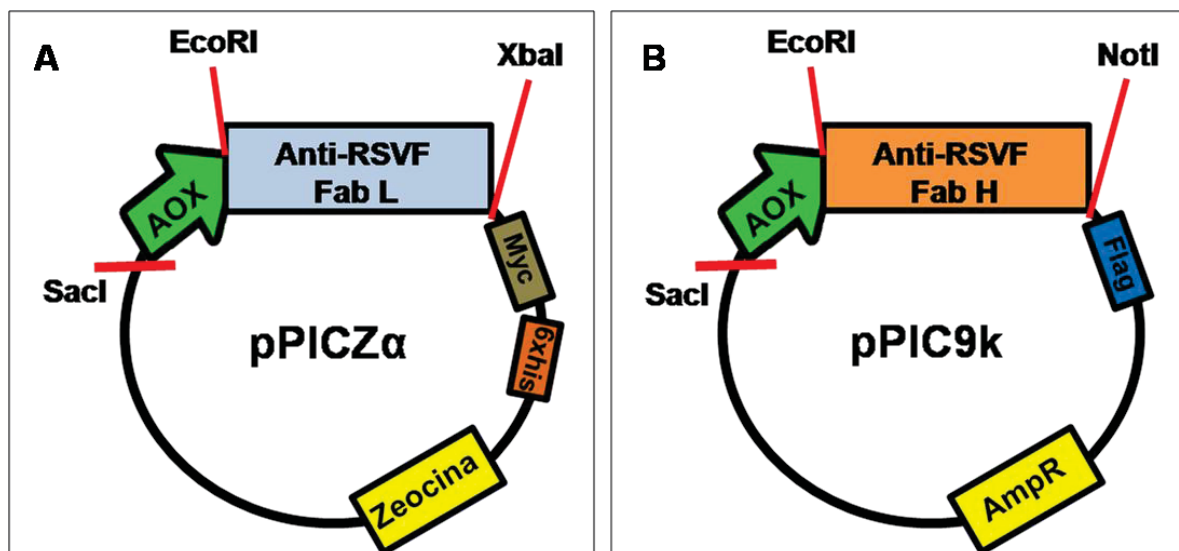
A sequência codificante da cadeia leve do Fab foi inserida no vetor de expressão pPICZαA usando-se os sítios de restrição *EcoRI* e *XbaI* (FIGURA 44A); a sequência codificante da cadeia pesada do Fab foi inserida no vetor de expressão pPIC9K nos sítios de restrição *EcoRI* e *NotI* (FIGURA 44B).

FIGURA 43 – CONFIRMAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES POR PCR



Genes codificantes das cadeias leves e pesadas dos fragmentos Fab do Palivizumabe e Motavizumabe. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M) Marcador de peso molecular *1kb plus* (Invitrogen); Pali) Insertos originados do anticorpo comercial Palivizumabe; Mota) Insertos originados do anticorpo comercial Motavizumabe; CL) Cadeia leve; CH) Cadeia pesada.

FIGURA 44 – ESQUEMAS DOS VETORES PARA EXPRESSÃO DO FRAGMENTO Fab DO ANTICORPO ANTI-F

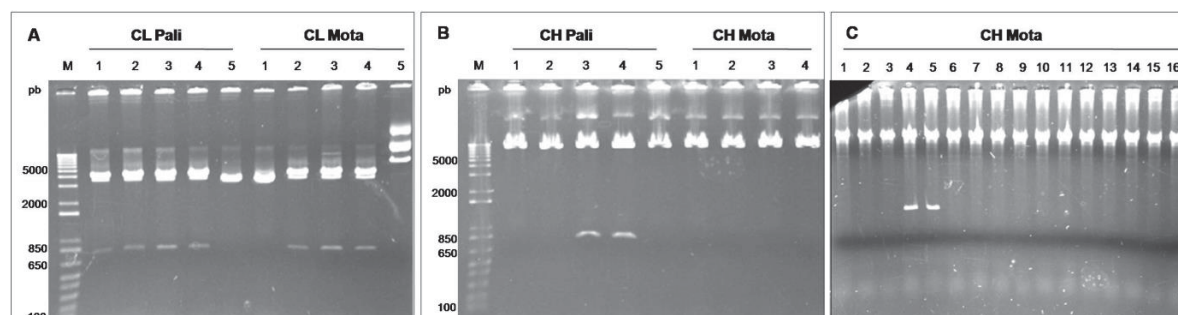


(A) e pesadas (B) dos Fab em *Pichia pastoris*, mostrando os sítios de restrições, as etiquetas foram fusionadas nas proteínas recombinantes seja através do vetor (Myc e 6xHis) ou inseridas no inserto durante o desenho das sequência (FLAG), Zeocina e AmpR conferem resistência as células transformadas com estes vetores e *SacI* é a endonuclease para a linearização dos vetores em frame com o AOX1, de forma a gerar os fenótipos Mut⁺ His⁺ na cepa GS115.

Estes vetores possuem o promotor AOX, que possibilita a indução com metanol, em *P. pastoris*, além do peptídeo sinal para secretar a proteína recombinante. O pPICZαA possui ainda as etiquetas 6xHis para a purificação da proteína por cromatografia de afinidade e c-Myc, para identificação da proteína nos ensaios imunológicos. Já o pPIC9K não possui etiqueta, porém, foi inserido durante a construção do gene, a sequência para codificação da etiqueta FLAG, para que dessa forma pudesse ser analisada individualmente nos imunoenaios. A cadeia pesada não possui etiqueta para purificação, porém, ao se dimerizar com a cadeia leve, consequentemente, foi purificada.

As FIGURAS 45A, B e C mostram a obtenção de clones positivos para todos os genes subclonados nos vetores de expressão. São considerados positivos aqueles com os insertos de tamanho esperado e banda única. Pode-se notar na FIGURA 45B a ausência de clones positivos para o CH do Motavizumabe. Neste caso, foi realizada uma nova ligação, e utilizado 16 colônias; destas apenas em 2 clones pôde se observar a presença do inserto (FIGURA 45C).

FIGURA 45 – CONFIRMAÇÃO DA SUBCLONAGEM DOS GENES CODIFICANTES DOS FRAGMENTOS Fab

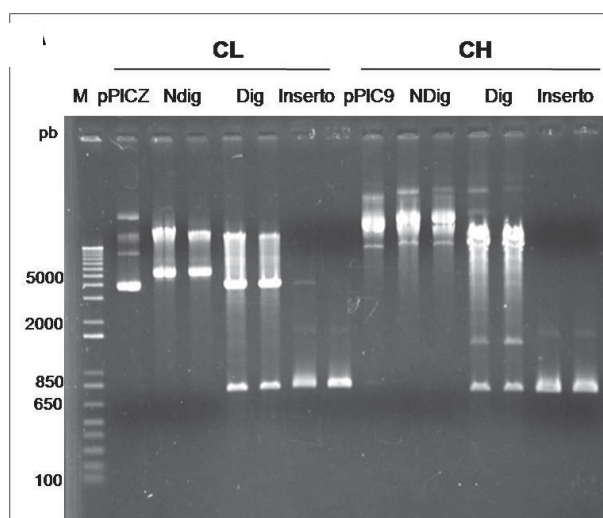


Screening de colônias transformadas com os vetores de expressão pPICZαA e pPIC9K, referentes aos genes das cadeias leves e pesadas do fragmento Fab do Palivizumabe e do Motavizumabe. Gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio, mostrando a presença do inserto no plasmídio com o seu tamanho molecular adequado, assim como sua integridade. Os números correspondem às diferentes colônias crescidas em placas sólidas com o meio seletivo adequado.

Uma vez tendo sido confirmada a inserção do gene nos vetores de expressão, o DNA deste clone foi amplificado em bactérias e uma alíquota de cada clone positivo foi enviada para o sequenciamento. Na FIGURA 46 pode ser observado os DNAs utilizados em cada etapa da subclonagem, assim como o DNA

amplificado, que foi utilizado para transformação de *P. pastoris* submetidas à indução com metanol, como mostram os resultados do item 4.3.2.

FIGURA 46 – SUBCLONAGEM DOS GENES DO FRAGMENTO Fab NOS VETORES DE EXPRESSÃO EM *P. pastoris*



Gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio. M) Marcador (1 Kb Plus DNA Ladder - Invitrogen). pPICZ) Vetor circular utilizado na subclonagem; Ndig) pPICZ contendo os fragmentos codificantes do Fab do Palivizumabe e Motavizumabe; Dig) pPICZ clivado com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*; Inserto) Produto da amplificação pela PCR do FabL do Palivizumabe e Motavizumabe clivados com as enzimas *EcoRI* e *XbaI*; pPIC9) Vetor circular utilizado para inserir os insertos; Ndig) pPIC9k ligado com o inserto FabH do Palivizumabe e Motavizumabe; Dig) pPIC9k com o inserto, clivado com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* do Palivizumabe e Motavizumabe; Inserto) Produto da amplificação pela PCR do gene FabH do Palivizumabe e Motavizumabe clivados com as enzimas *EcoRI* e *NotI*.

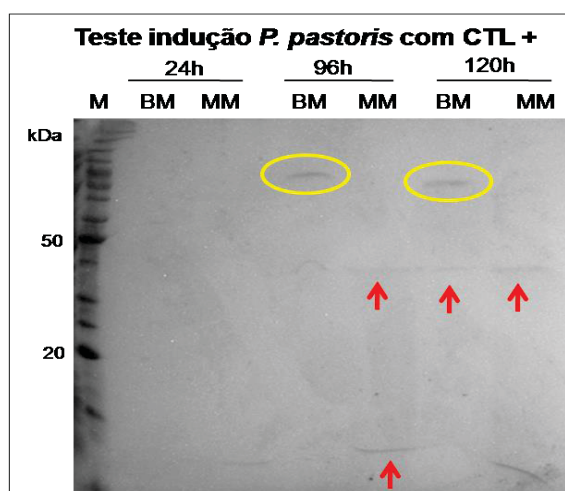
4.3.2 Testes de indução da expressão em levedura

As propriedades estruturais dos anticorpos requerem um sistema de expressão que forneça o dobramento correto destas moléculas além de ambiente oxidante para que ocorra a interação entre as cadeias. Consequentemente, muitos sistemas de expressão tradicional não fornecem estes mecanismos para a produção eficiente dos mAbs ou fragmentos de mAbs. Fatos estes, que fazem da levedura um excelente sistema para produção de fragmentos Fab de anticorpos sintéticos. *P. pastoris* representa a cepa mais utilizada para a produção de anticorpos recombinantes; possui ótima capacidade na produção e secreção de proteínas heterólogas, aliado ao fato de que não secreta grandes quantidades de proteínas próprias, simplificando o processamento *downstream* (FRENZEL; HUST; SCHIRRMANN, 2013).

Visando a familiarização com protocolos de expressão de proteínas recombinantes em leveduras, um teste inicial de indução foi realizado utilizando a cepa *GS115* transformada comercialmente com o gene da albumina humana secretada (HSA), que geralmente é utilizada como controle positivo de indução. Neste propósito inicial, foram testados dois meios de indução, o MMH (meio mínimo com histidina) e o BMMH (meio mínimo com histidina tamponado, pH 6) com indução por metanol (0.5%, por 5 dias).

As células de cada uma das alíquotas (retiradas a cada 24 horas de indução) foram coletadas por centrifugação e as proteínas presentes no sobrenadante foram precipitadas com acetona 100% para posterior análise por SDS-PAGE. Conforme mostra a FIGURA 47, foi possível verificar a presença da albumina a partir de 96 horas de indução, somente no meio tamponado (círculo amarelo) e a presença de duas bandas abaixo do tamanho esperado para a albumina, apenas na indução realizada no meio não tamponado, indicando a presença de contaminantes ou degradação. Estes fatos indicaram que a indução dos fragmentos Fabs deveria ser realizada em meio tamponado, assim como, ser utilizado o meio complexo ao invés do mínimo, a fim de obter maior rendimento da proteína.

FIGURA 47 – PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO EM *P. pastoris*

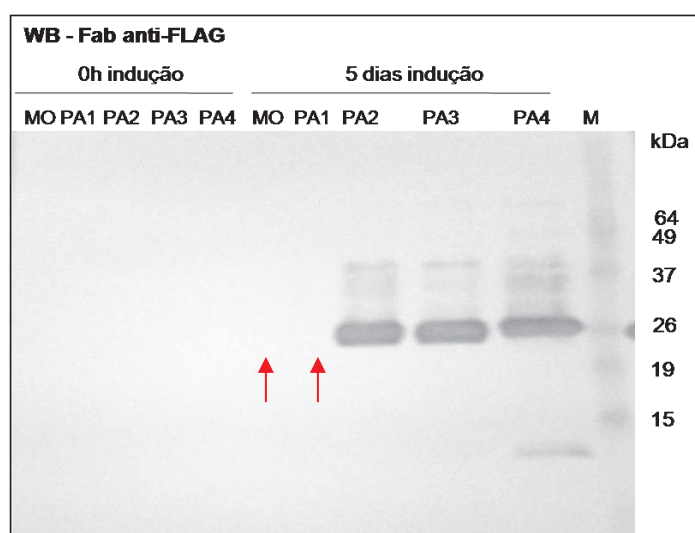


Análise por SDS-PAGE dos testes de indução do controle positivo (HSA) em levedura utilizando meio tamponado e não tamponado. BM) Meio de indução tamponado; MM) Meio de indução não tamponado; 24, 96 e 120h, correspondem ao período de indução. As setas vermelhas representam a presença de proteínas não esperadas. O círculo amarelo representa o peso molecular esperado para a proteína HSA.

Após a confirmação da inserção simultânea dos genes, correspondentes as cadeias leves e pesadas dos fragmentos Fabs do Palivizumabe e Motavizumabe, no

genoma das células co-transformadas de *P. pastoris*, através de concentrações gradativas dos respectivos antibióticos seletivos, observou-se a presença de três colônias na concentração máxima testada (1 mg/mL de geneticina e 1 mg/mL de zeocina), referentes ao fragmento Fab do anticorpo Palivizumabe, e duas colônias na concentração mínima (0,1 mg/mL de geneticina e 0,1 mg/mL de zeocina), sendo, uma colônia referente ao fragmento Fab do Palivizumabe e outra ao fragmento Fab do Motavizumabe. Cada uma destas colônias foi crescida em meio líquido e induzidas com metanol para obtenção dos fragmentos Fabs recombinantes (FIGURA 48).

FIGURA 48 – CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS FRAGMENTOS Fab



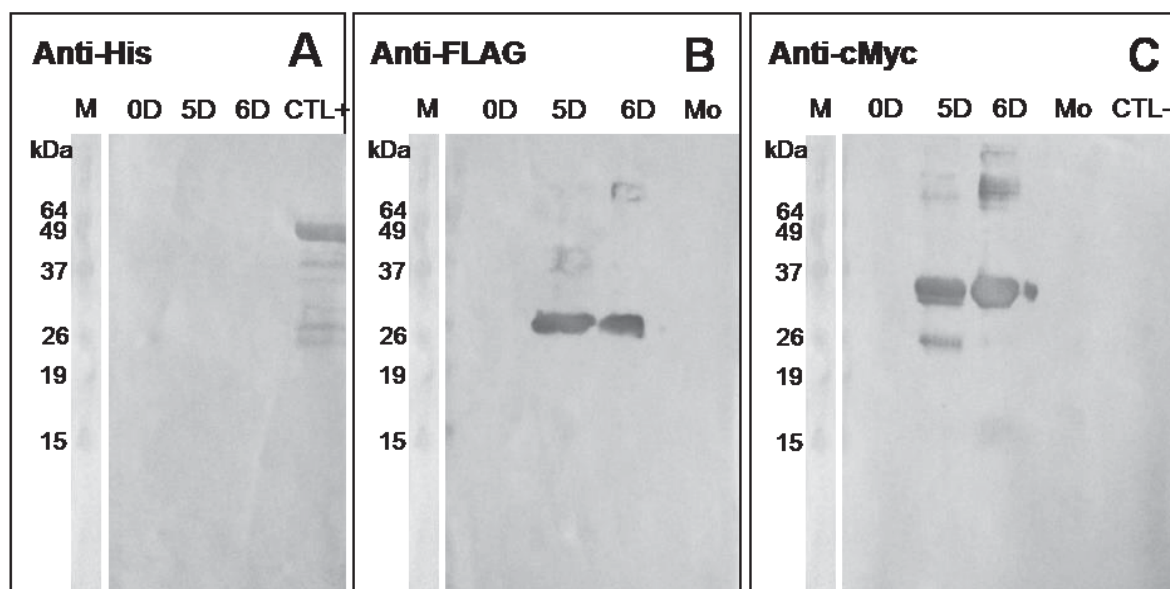
Ensaio de *Western Blot*. Mo) Teste de indução de 5 dias com uma colônia transformante com gene do fragmento Fab do Motavizumabe. PA) Teste de indução com 4 colônias transformantes com o gene do fragmento Fab do Palivizumabe (PA1, PA2, PA3 e PA4). M) Marcador de peso molecular pré-corado *Bench Marker*. As setas indicam a ausência dos fragmentos Fab em relação ao peso molecular esperado para estas proteínas.

A confirmação da expressão das cadeias leves e pesadas dos fragmentos Fabs foi realizada através do *Western blot*, já que estas proteínas se encontravam altamente diluídas no meio de cultivo, uma vez que são secretadas logo após serem sintetizadas. Além disso, por possuírem peso molecular semelhantes, se co-localizam no SDS-PAGE.

Após as 120 horas de indução em meio complexo, foi possível detectar a presença da proteína de interesse, com peso molecular esperado para as cadeias leve e pesada, nas três colônias crescidas na maior concentração dos antibióticos (FIGURA 48 e 49). Indicando com isso, que várias cópias destes genes foram

integradas no genoma destas células. Em contrapartida, nesta mesma figura, pôde-se observar a ausência destas proteínas nas canaletas referentes às colônias crescidas na menor concentração dos antibióticos, indicando provavelmente, uma subexpressão, devido a integração de apenas uma única cópia de cada gene no genoma destas células. A expressão da cadeia pesada foi confirmada através do anticorpo anti-FLAG. A expressão da cadeia leve, apesar de possuir também a etiqueta 6xHis, foi confirmada somente através do anticorpo anti-Myc (FIGURA 49A e C). O período de indução de 0 horas, foi utilizado aqui como controle negativo de indução.

FIGURA 49 – CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS CADEIAS LEVES E PESADAS DOS FRAGMENTOS Fab POR ENSAIOS DE *WESTERN BLOT*

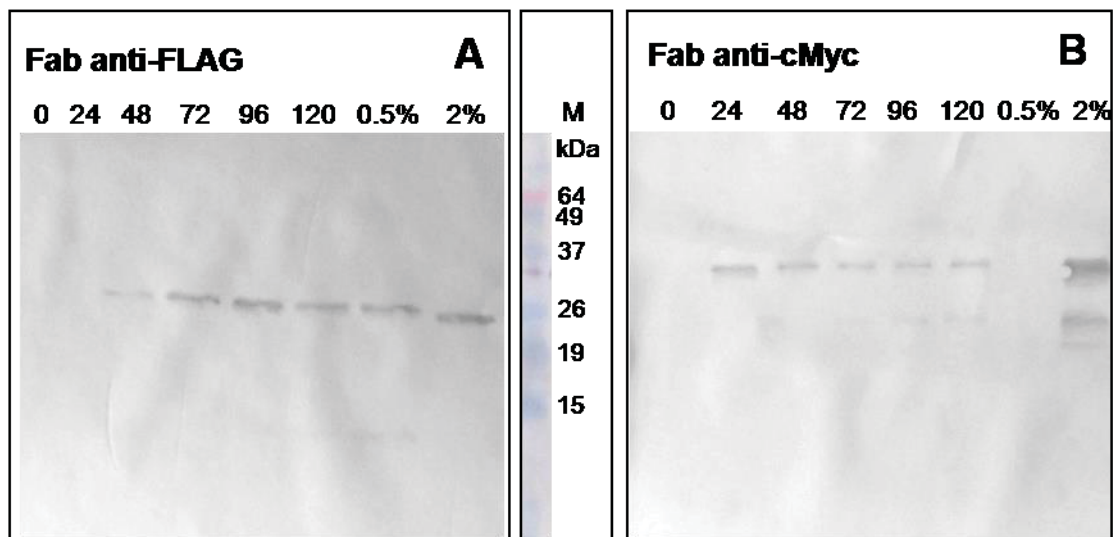


O sobrenadante do meio de cultura de cada alíquota foi concentrado 5x para aplicação no SDS-PAGE. A) (Anti-His) Detecção da cadeia leve do fragmento Fab, a qual possui cauda 6xHis adquirida do vetor de expressão. B) (Anti-FLAG) Detecção da cadeia pesada do fragmento Fab, a qual foi inserida em sua sequência gênica os nucleotídeos codificadores para a etiqueta FLAG. 0, 5, 6 D) Se referem ao tempo de indução, em dias. C) (Anti-cMyc) Detecção da cadeia leve do fragmento Fab, a qual possui uma cauda adicional do epítipo c-Myc, adquirida do vetor de expressão. CTL+) Controle positivo da reação (antígeno recombinante HRSV-F1, que contém a etiqueta 6xHis, detectado pelo anticorpo anti-His). Mo) Expressão do fragmento Fab do anticorpo comercial Motavizumabe. CTL-) Controle negativo da indução (Cepa GS115, de *Pichia pastoris*, não transformadas, crescidas e induzidas nas mesmas condições das demais). M) Marcador de peso molecular pré-corado *Bench Marker*.

A FIGURA 50A (detecção da cadeia pesada) e 50B (detecção da cadeia leve) mostram a análise de diferentes tempos de indução e diferentes concentrações do indutor metanol. Após estas análises, optou-se por utilizar a colônia 3 do

Palivizumabe para indução com volumes maiores (0,5 L de meio de cultura) por 5 dias utilizando 1% de metanol, condições estas, estabelecidas de acordo com as análises da expressão através do *Western blot*.

FIGURA 50 – TESTES DE EXPRESSÃO DO FRAGMENTO Fab EM *P. pastoris*



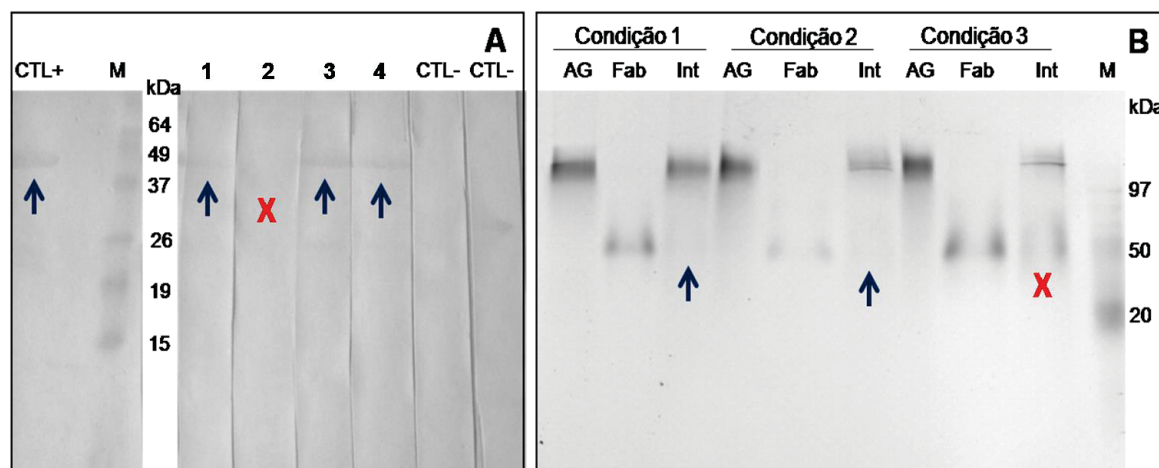
Ensaio de *Western blot* para avaliar diferentes tempos de indução, assim como diferentes concentrações do indutor metanol. Indução com 1% de metanol ao longo das 120 horas de incubação à 30°C, 250 RPM. O sobrenadante do meio de cultura de cada alíquota foi concentrado 5x para esta análise. A) (Fab anti-FLAG) Detecção da cadeia pesada do fragmento Fab. B) (Fab anti-cMyc) Detecção da cadeia leve do fragmento Fab. 0, 24, 48, 72, 96, 120) Se referem ao tempo de indução, em horas, as quais foram retiradas as alíquotas. 0.5%, 2%) Testes de indução com diferentes concentrações de metanol (0.5 e 2%), indutor da expressão, realizado a 30°C por 120 horas. M) Marcador de peso molecular pré-corado (*Bench Marker*).

Através dos ensaios *Western blot* foram realizados também os ensaios de interação do fragmento Fab com o seu respectivo antígeno (Proteína HRSV-F1, solubilizados dos corpos de inclusão de *E. coli*), tendo como controle positivo o anti-HRSV-F1 policlonal. Apesar da baixa intensidade na coloração da membrana de nitrocelulose, foi possível verificar que o fragmento Fab derivado do Palivizumabe foi capaz de interagir com o antígeno imobilizado em meio sólido em condições desnaturantes (FIGURA 51A), apesar de relatos em literatura afirmando que o epítipo alvo para este mAb é conformacional (CORTI et al., 2013; McLELLAN, 2015).

As análises através do PAGE nativo (não desnaturante) corroboraram com os ensaios de interação do *Western blot*, pois esta análise permitiu constatar que as cadeias leves e pesadas do fragmento Fab estão interagindo. Tanto a cadeia leve quanto a cadeia pesada do fragmento Fab em sua forma monomérica, apresentam

peso molecular em torno de 25 kDa (FIGURA 51A), entretanto, ao se interagirem, devem apresentar um peso molecular em torno de 50 kDa (FIGURA 51B), o que corresponde as somas do peso molecular de ambas cadeias, indicando a dimerização destas moléculas, consequentemente, sua funcionalidade.

FIGURA 51 - ANÁLISE DA INTERAÇÃO ANTÍGENO-ANTICORPO



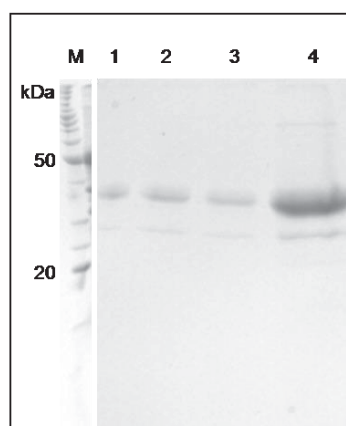
A) Análise através de *Western blot*, onde o antígeno F1 do HRSV foi imobilizado em membrana de nitrocelulose por *trans-blot* e incubado com o Fab recombinante (5 µg/mL). Esta reação foi incubada com o anti-Flag (1:5000) e posteriormente com o anti-mouse conjugado com a fosfatase alcalina (1:5000). CTL+) Controle positivo da reação (antígeno recombinante F1 contendo a etiqueta 6xHis). M) Marcador de peso molecular pré-corado *Bench Marker*. 1) Ensaio utilizando a primeira eluição da afinidade. 2) Ensaio utilizando a alíquota da cromatografia de gel filtração congelada/descongelada 3x. 3) Ensaio utilizando alíquota da cromatografia de gel filtração liofilizada e dissolvida em PBS. 4) Ensaio utilizando a alíquota da cromatografia de gel filtração liofilizada e dissolvida em água ultrapura. CTL-) Controle negativo do ensaio (primeiro: incubação do antígeno F1 imobilizado com o anti-FLAG; segundo: de modo semelhante aos demais, porém foi utilizado a eluição da purificação do controle negativo da indução. As setas indicam a ocorrência da interação antígeno-anticorpo e o X indica a ausência. B) Análise da interação antígeno-anticorpo através de PAGE não desnaturante. Gel 12% corado com *Coomassie R-250*. Foi aplicado no gel, alíquota do ensaio de interação tendo 2:1 de volume antígeno:anticorpo em solução, quando incubados por 15 minutos a 37°C. Condição 1) Ensaio realizado utilizando alíquota do Fab da purificação por afinidade. Condição 2) Ensaio realizado utilizando alíquota do Fab da cromatografia de gel filtração, liofilizado e dissolvido em PBS. Condição 3) Ensaio realizado utilizando alíquota do Fab da cromatografia de gel filtração, liofilizado e dissolvido em água ultrapura. AG) Antígeno recombinante HRSV-F1. Fab) Fragmento recombinante Fab do Palivizumabe. Int) Alíquota da reação de interação antígeno-anticorpo (fragmento Fab). M) Marcador de peso molecular *Jena Bioscience*. As setas mostram a ausência do fragmento Fab na altura do seu peso molecular esperado, indicando sua interação com o antígeno recombinante. O X mostra a presença do fragmento Fab na altura do seu peso molecular esperado, indicando a não interação desta molécula com seu respectivo antígeno, quando submetido à condição 3.

Através do PAGE nativo foi possível verificar também que nas condições 1 e 2, ocorreram a interação do fragmento Fab (peso molecular ~50 kDa) com o antígeno recombinante (peso molecular de 51 kDa), já que é possível observar a presença de bandas com peso molecular acima de 100 kDa e ausência de bandas

com peso molecular correspondente ao fragmento Fab, indicando que estas moléculas interagiram com o antígeno. Por outro lado, na condição 3 pode ser observado a presença de proteína com peso molecular em torno de 50 kDa, indicando que as moléculas não se ligaram ao antígeno (FIGURA 51B). As canaletas referentes aos antígenos recombinantes apresentam bandas de peso molecular acima de 100 kDa, como este antígeno em sua forma monomérica apresenta 51 kDa, provavelmente, nesta condição esteja em sua forma oligomérica, já que consta em literatura que esta proteína forma trímeros (McLELLAN et al., 2010). As canaletas referentes aos ensaios de interação, contendo os antígenos com os fragmentos, não apresentam diferenças significativas em relação aos seus pesos moleculares, o que pode ser devido a baixa resolução de géis nativos na separação de proteínas de altos pesos moleculares (DA CUNHA; DOMINGUES; DE PAULA, 2011).

Antes da utilização nos imunoenaios, os anticorpos foram submetidos a um teste simples de estabilidade. Estes ensaios foram analisados através de SDS-PAGE, onde foi possível verificar que após 15 dias em temperatura ambiente, o fragmento Fab apresentou o mesmo padrão, quando comparados ao mesmo período a 4°C, assim como quando congelado/descongelado três vezes (FIGURA 52) ou liofilizado e reconstituído em água ultrapura. Todas as alíquotas aplicadas neste teste estavam no tampão de armazenamento (PBS pH 7,2; 0,1% Tween-20, 20% de glicerol).

FIGURA 52 – TESTE DE ESTABILIDADE DO FRAGMENTO Fab

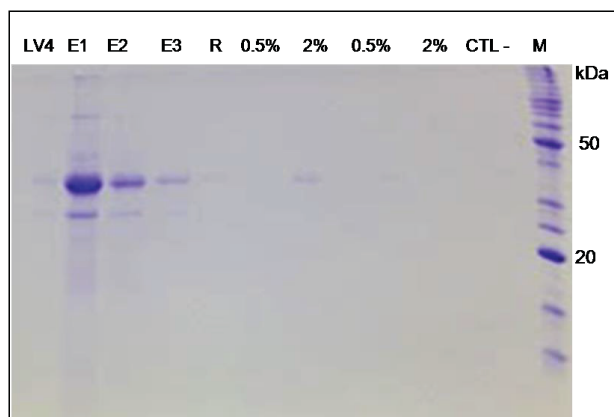


Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de *Coomassie* R-250. M) Marcador de peso molecular. 1) Alíquota da purificação por afinidade em bancada, congelado/descongelado três vezes. 2) Alíquota da purificação por afinidade em bancada submetidas a 4°C por 15 dias. 3) Alíquota da purificação por afinidade em bancada submetidas a temperatura ambiente (~25°C) por 15 dias. 4) Alíquota da purificação por afinidade em bancada, liofilizada e reconstituída em água ultrapura. M) Marcador de peso molecular *Bench Marker*.

4.3.3 Purificação dos fragmentos Fab secretados

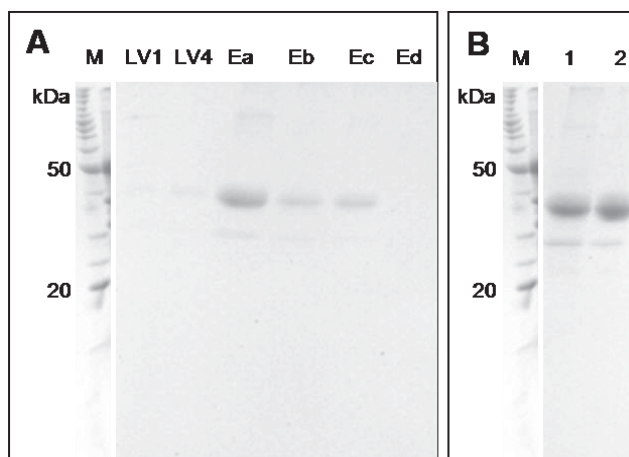
Um dos melhores métodos para concentrar as proteínas que são secretadas no meio de cultivo é através da cromatografia de afinidade, pois estas proteínas se encontram altamente diluídas; o que é característico de proteínas recombinantes expressadas em *P. pastoris* (FRENZEL; HUST; SCHIRRMANN, 2013). Vários testes foram realizados para aperfeiçoar este método, visto que o fragmento Fab se mostrou com baixa afinidade pela resina de níquel (FIGURAS 53, 54, 55), tanto em suspensão, quanto quando imobilizada na coluna, em ensaios de escala maior no akta (FIGURA 56A).

FIGURA 53 – TESTES DE PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO Fab



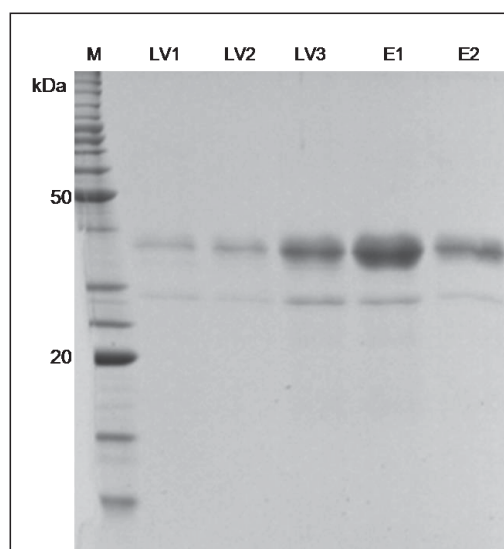
Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de *Coomassie* R-250. LV4) Última lavagem. E1) Primeira eluição. E2) Segunda eluição. E3) Terceira eluição. R) Resina após as três eluições. 0,5 e 2% se tratam das diferentes concentrações de metanol testadas na indução, CTL -) Controle negativo (indução com a cepa não transformada, submetidas nas mesmas condições das demais expressões). M) Marcador de peso molecular pré-corado *Bench Marker*.

FIGURA 54 – TESTES DE PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO Fab



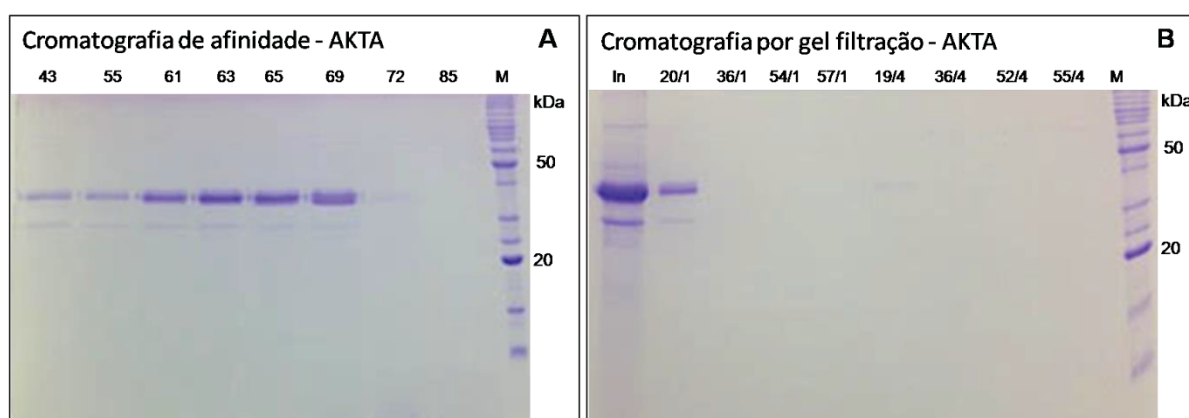
Análise por SDS-PAGE. A) Frações da cromatografia de afinidade realizada em bancada, do sobrenadante da indução de *Pichia pastoris* por cinco dias, sendo os fragmentos Fab secretados no meio de indução após sua síntese. M) Marcador de peso molecular. LV1) Primeira lavagem. LV4) Última lavagem. Ea) Eluição da purificação da indução com 1% de metanol. Eb) Eluição da purificação da indução com 0,5% de metanol. Ec) Eluição da indução com 2% de metanol. Ed) Eluição da purificação do controle negativo da indução (indução realizada com células não transformadas). B) Frações da cromatografia de afinidade realizada em bancada, do sobrenadante da indução de *Pichia pastoris* por cinco dias, induzidas por metanol (1%). M) Marcador de peso molecular. 1) Purificação da indução com 100 mL de meio de cultivo. 2) Purificação da indução com 500 mL de meio de cultivo.

FIGURA 55 – TESTES DE PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO Fab



Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie.R-250. M) Marcador de peso molecular. LV1) Primeira lavagem. LV2) Segunda lavagem (com tampão sem imidazol). LV3) Lavagem com 50 mM de imidazol. E1) Primeira eluição (com 500 mM de imidazol). E2) Segunda eluição (com 500 mM de imidazol).

FIGURA 56 – ETAPAS DA PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO Fab NO AKTA



Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie R-250. A) Purificação por cromatografia de afinidade. Frações desde o segmento de lavagem até a eluição final com 100% do tampão de eluição. B) Cromatografia de gel filtração (segunda etapa de purificação). Frações da cromatografia ao longo do método. /1, /4 representa as diferentes corridas realizadas sucessivamente. M) Marcador de peso molecular *Bench Marker*.

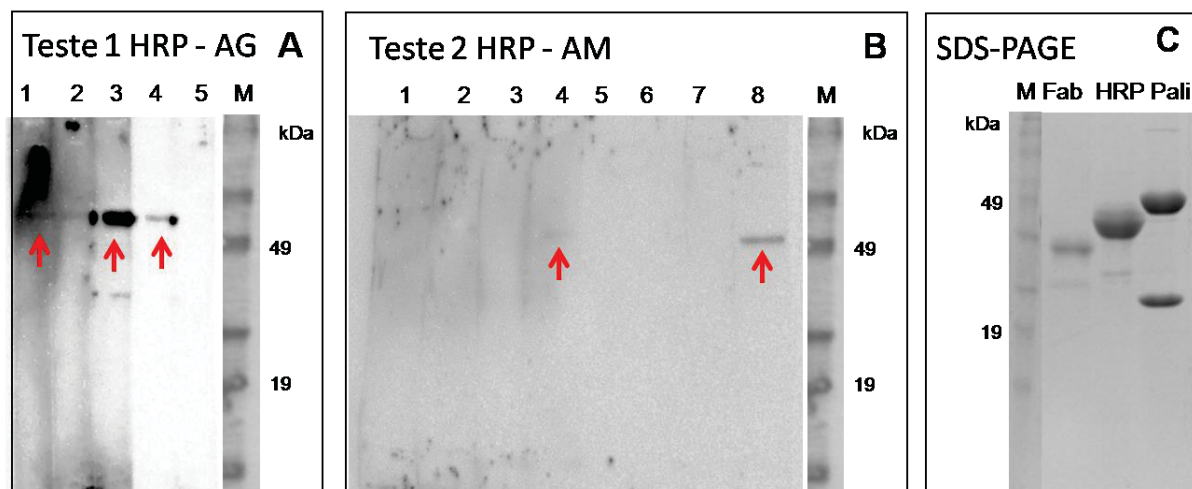
Os resultados aqui apresentados mostraram que foi possível a produção em maior escala com rendimento e desempenho de modo semelhante ao utilizado pequenos volumes (100 mL) durante a indução. Porém, o método de purificação com melhor rendimento foi obtido manualmente em bancada. A purificação por gel filtração não se mostrou eficiente, além disso, por ser um tipo de cromatografia que dilui a amostra ao longo do processo de purificação, foi necessário um passo adicional, para concentrar a proteína novamente (FIGURA 56B). Após as etapas de purificação e dos ensaios de estabilidade, os fragmentos Fab foram quantificados e utilizados em imunoenaios seja como molécula para captura ou como reveladora, quando conjugados à peroxidase.

4.3.4 Obtenção dos anticorpos conjugados com peroxidase

Após uma primeira tentativa em conjugar moléculas dos fragmentos Fab e do Palivizumabe com a peroxidase, pôde ser verificado na FIGURA 57 que apesar do baixo rendimento, foi possível a detecção tanto do antígeno recombinante HRSV-F1 quanto das moléculas deste antígeno presentes nas amostras clínicas de pacientes conhecidamente positivos para infecção pelo HRSV, reforçado pela ausência da reação na canaleta referente ao controle negativo.

Em relação a intensidade do sinal dos ensaios de *Western blot*, o desempenho do fragmento Fab foi muito inferior à molécula inteira (Palivizumabe). Este fato, provavelmente, pode ser atribuído a baixa concentração do fragmento Fab utilizada durante o procedimento de conjugação, em relação à concentração do Palivizumabe (FIGURA 57C). Além disso, por ser um fragmento, esta molécula pode possuir menor quantidade de aminoácidos aminados, em sua estrutura, em relação a molécula de IgG completa. Com isso, fornecem poucos sítios para ligação das moléculas de peroxidase, em relação aos vários sítios disponível no caso da molécula completa (KOLIASNIKOV et al., 2011). Portanto, deve ser utilizada maior quantidade do fragmento Fab em relação a do Palivizumabe, ao contrário do realizado.

FIGURA 57 – CONJUGAÇÃO DOS ANTICORPOS COM A ENZIMA PEROXIDASE



Análise através de ensaios de *Western blot*. Testes iniciais de conjugação da molécula inteira do anticorpo comercial (Palivizumabe) ou do fragmento Fab. A) Teste utilizando o antígeno recombinante F1. 1) Incubação da membrana contendo o antígeno imobilizado com o conjugado Fab-HRP (1:500) por 60 minutos. 2) Incubação da membrana contendo o antígeno imobilizado com o conjugado Fab-HRP (1:1000) por 60 minutos. 3) Incubação da membrana contendo o antígeno imobilizado com o conjugado Palivizumabe-HRP (1:500) por 60 minutos. 4) Incubação da membrana contendo o antígeno imobilizado com o conjugado Palivizumabe-HRP (1:5000) por 60 minutos. 5) Controle negativo (incubação da membrana contendo a proteína comercial BSA com o conjugado Palivizumabe-HRP (1:500) por 60 minutos. B) Teste utilizando amostras clínicas sabidamente positivas para infecção pelo HRSV. 1-4) Incubação da membrana contendo a amostra clínica com diferentes diluições do conjugado Fab-HRP (1:500, 1:250; 1:100; 1:50) por 60 minutos. 5-8) Incubação da membrana contendo a amostra clínica com diferentes diluições do conjugado Palivizumabe-HRP (1:6000, 1:4000, 1:2000, 1:1000) por 60 minutos. C) Análise das moléculas utilizadas no protocolo de conjugação. Fab) Alíquota do Fragmento Fab. HRP) Enzima peroxidase comercial. Pali) Anticorpo monoclonal comercial do qual se derivou o fragmento Fab. M) Marcador de peso molecular pré-corado *Bench Marker*.

Para a utilização do conjugado Fab-HRP nos imunoenaios, o protocolo ainda requer otimizações, tais como, utilização do fragmento Fab altamente concentrado ou alterações nas composições dos tampões de conjugação, ou ainda, expressar o fragmento Fab já conjugado com a peroxidase. Consta na literatura que este tipo de molécula conjugada à peroxidase já foi obtida com sucesso em *P. pastoris*, com ótimo desempenho (KOLIASNIKOV et al., 2011). Moléculas deste tipo podem ser altamente precisas e específicas nos imunoenaios diretos, sendo uma ótima opção para aplicação nos testes de diagnóstico de vários patógenos (FRENZEL; HUST; SCHIRRMANN, 2013). Os anticorpos policlonais não foram utilizados neste protocolo devido aos seus baixos rendimentos durante a etapa de purificação do soro. Portanto, todas as etapas dos imunoenaios, foram realizadas através do método indireto.

4.4 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS

A validação dos anticorpos foi realizada frente a três tipos diferentes de imunoensaios, com níveis distintos de sensibilidade e amplamente utilizados em diagnóstico: ELISA, sistema *Luminex* e *Western blot*.

Os ensaios imunológicos através da plataforma *Luminex* são muito promissores. Este sistema consiste num arranjo de microesferas de polietileno em suspensão impregnadas com diferentes tipos e quantidades de fluoróforos, gerando assim, um conjunto de microesferas diferenciadas, que servem como suporte sólido onde podem ser imobilizadas diferentes moléculas de captura. Esse sistema é capaz de identificar e quantificar as interações de acordo com a intensidade de sinal emitido pela fluorescência da molécula reveladora (DUNBAR et al., 2003; SPIRO; LOWE; BROWN, 2000). A estratégia de microesferas diferenciadas, permite a detecção simultânea de múltiplos patógenos numa quantidade mínima de amostra, com alta velocidade de processamento (DUNBAR et al., 2003), possibilitando desta forma a caracterização tanto das moléculas quando das amostras clínicas para a validação.

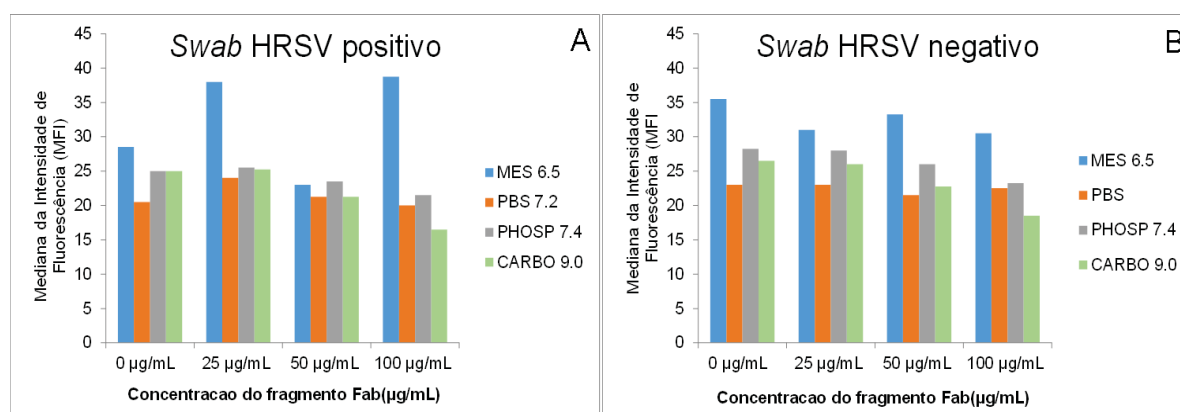
O *Western blot* combina a alta resolução da eletroforese em gel com a especificidade de detecção. Este método é muito utilizado em laboratórios de diagnóstico para identificar e/ou caracterizar agentes infecciosos com base na especificidade antigênica ou como teste confirmatório para os resultados não conclusivos de outros ensaios. Porém, por ser uma técnica desnaturante, sua principal limitação está na detecção de epítomos conformacionais (OIE, 2009). Já os ensaios de ELISA, permitem avaliar a molécula em sua conformação nativa, porém, é o menos sensível entre estes métodos.

A detecção de vírus respiratórios é altamente dependente do tipo da amostra coletada. O tempo de coleta após o início dos sintomas clínicos, a idade do paciente, o transporte e armazenamento das amostras antes do ensaio (GINOCCHIO; MCADAM, 2011) podem interferir diretamente nos resultados. Vários espécimes do trato respiratório superior são aplicáveis para o diagnóstico, incluindo lavagens nasofaríngeal, aspirados nasofaríngeal e *swabs* nasofaríngeal (GINOCCHIO; MCADAM, 2011), que podem ser mais adequados para determinados métodos de diagnósticos do que para outros (GINOCCHIO; MCADAM, 2011; KIM et al., 2011; SALEZ et al., 2015), dificultando assim, uma comparação efetiva entre os diferentes métodos de diagnóstico. Os antígenos recombinantes produzidos em *E. coli* foram

utilizados como controles positivos para facilitar a padronização das amostras clínicas nos imunoenaios.

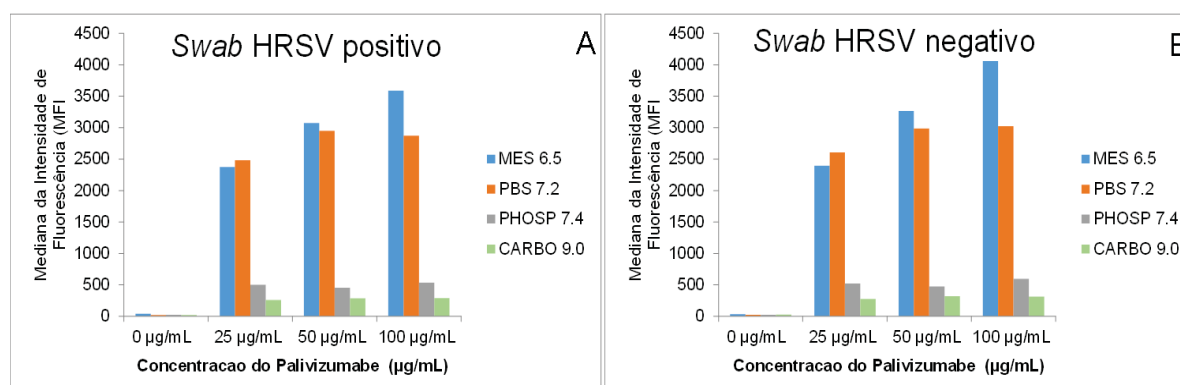
Utilizando o *swab* nasofaríngeal coletado em 2014 de pacientes com sintomas de infecções respiratórias nos ensaios de ELISA e sistema *Luminex*, não foi possível caracterizar as amostras positivas e negativas. Após os vários testes no sistema *Luminex* variando as condições de cada etapa do ensaio, assim como diferentes combinações de moléculas para a detecção do vírus (TABELA 8), a intensidade mediana de fluorescência, em todas as condições testadas não apresentaram diferenças significativas entre as amostras clínicas analisadas e o controle negativo (FIGURA 58, 59 e 60). Resultados semelhantes em relação as amostras clínicas foram também observados no ELISA (FIGURA 61), porém, pelo fato do *Luminex* ser um método de maior sensibilidade, melhores resultados eram esperados.

FIGURA 58 – ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DO FRAGMENTO FAB NA PLATAFORMA *LUMINEX*



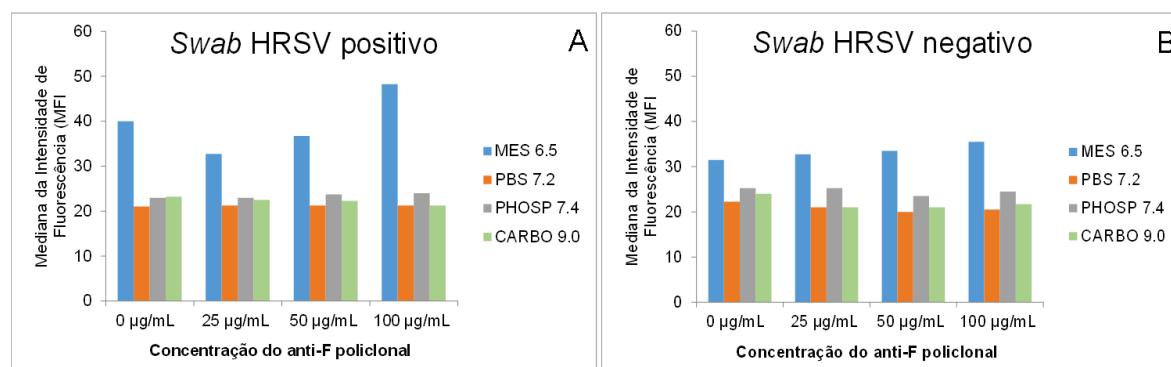
Análise do efeito de diferentes pHs e diferentes concentrações do fragmento Fab no acoplamento destas moléculas com as microesferas. Nestes ensaios foram utilizadas amostras clínicas coletadas através do *swab* nasofaríngeal de pacientes com sintomas de infecções respiratórias agudas, previamente caracterizadas pelo qRT-PCR. A) Amostras diagnosticadas como positivas pelo qRT-PCR. B) Amostras diagnosticadas como negativas pelo qRT-PCR.

FIGURA 59 - ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DO PALIVIZUMABE NA PLATAFORMA *LUMINEX*



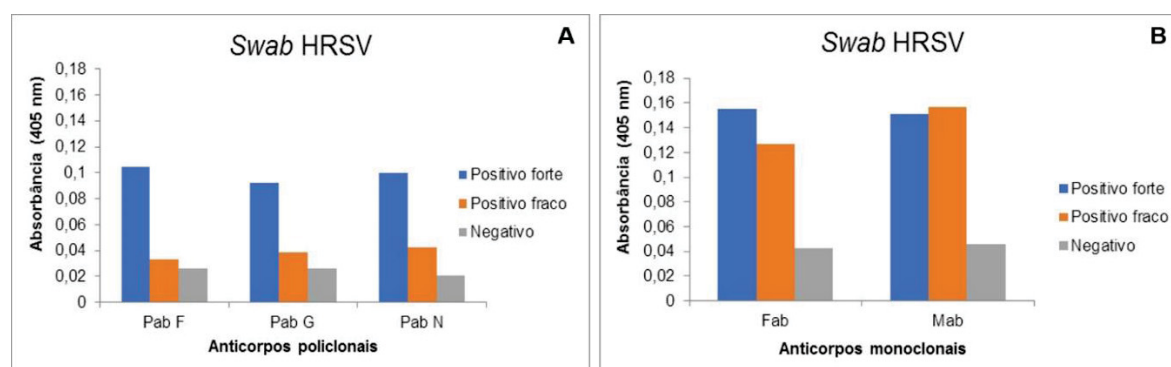
Análise do efeito de diferentes pHs e diferentes concentrações do Palivizumabe no acoplamento destas moléculas com as microesferas. Nestes ensaios foram utilizadas amostras clínicas coletadas através do *swab* nasofaríngeal de pacientes com sintomas de infecções respiratórias agudas, previamente caracterizadas pelo qRT-PCR. A) Amostras diagnosticadas como positivas pelo qRT-PCR. B) Amostras diagnosticadas como negativas pelo qRT-PCR.

FIGURA 60 - ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS NA PLATAFORMA LUMINEX



Análise do efeito de diferentes pHs e diferentes concentrações do anti-F policlonal no acoplamento destas moléculas com as microesferas. Nestes ensaios foram utilizadas amostras clínicas coletadas através do *swab* nasofaríngeal de pacientes com sintomas de infecções respiratórias agudas, previamente caracterizadas pelo qRT-PCR. A) Amostras diagnosticadas como positivas pelo qRT-PCR. B) Amostras diagnosticadas como negativas pelo qRT-PCR.

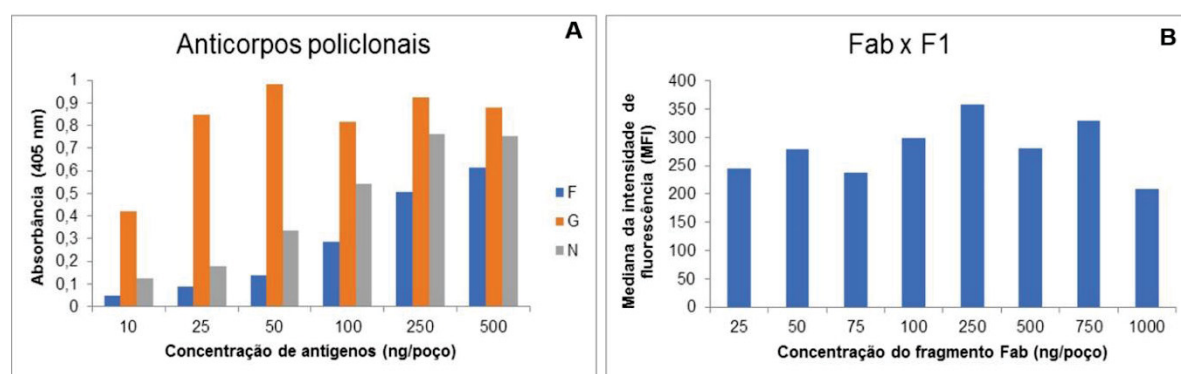
FIGURA 61 – ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DOS ANTICORPOS ATRAVÉS DA PLATAFORMA ELISA



Nestes ensaios foram utilizadas amostras clínicas coletadas através do *swab* nasofaríngeal de pacientes com sintomas de infecções respiratórias agudas, previamente caracterizadas pelo qRT-PCR. A) Análise da capacidade dos anticorpos policlonais para detectar as amostras positivas e negativas. Pab F) Anti-F1 policlonal. Pab G) Anti-G policlonal. Pab N) Anti-N policlonal. B) Análise da capacidade dos anticorpos monoclonais para detectar as amostras positivas e negativas. Fab) Fragmento Fab recombinante do anticorpo Palivizumabe. Mab) Anticorpo comercial Palivizumabe. Positivo forte) Se refere as amostras clínicas com o valor CT baixo (alta carga viral). Positivo fraco) Amostras clínicas com o valor CT alto (baixa carga viral). Negativo) Amostras clínicas determinadas negativas para qualquer infecção respiratória viral através do qRT-PCR.

Nos ensaios de ELISA, conforme mostra a FIGURA 62, somente foi possível a obtenção de resultados razoáveis nos testes controles, aqueles nos quais foram utilizados somente as moléculas desenvolvidas neste projeto (TABELA 12), as quais incluem os antígenos, anticorpos policlonais e fragmentos de anticorpos; cujo objetivo foi verificar a funcionalidade destas moléculas. Através destes ensaios observamos que os anticorpos policlonais, assim como o fragmento Fab são capazes de reconhecer seus respectivos antígenos recombinantes em solução e em condições não desnaturantes (FIGURA 61B). O fragmento Fab apresenta um desempenho semelhante a molécula de anticorpo completa.

FIGURA 62 – ENSAIOS DE INTERAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES COM SEUS RESPECTIVOS ANTICORPOS ATRAVÉS DO ELISA



A) Ensaios utilizando os três antígenos recombinantes em diferentes concentrações, imobilizados em placas de ELISA, contra seus respectivos anticorpos policlonais. F) antígeno HRSV-F1. G) antígeno HRSV-G. N) antígeno HRSV-N. B) Ensaios utilizando diferentes concentrações do fragmento Fab imobilizado em placas de ELISA, contra a proteína F1 recombinante e detecção através do anti-F1 policlonal e anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina.

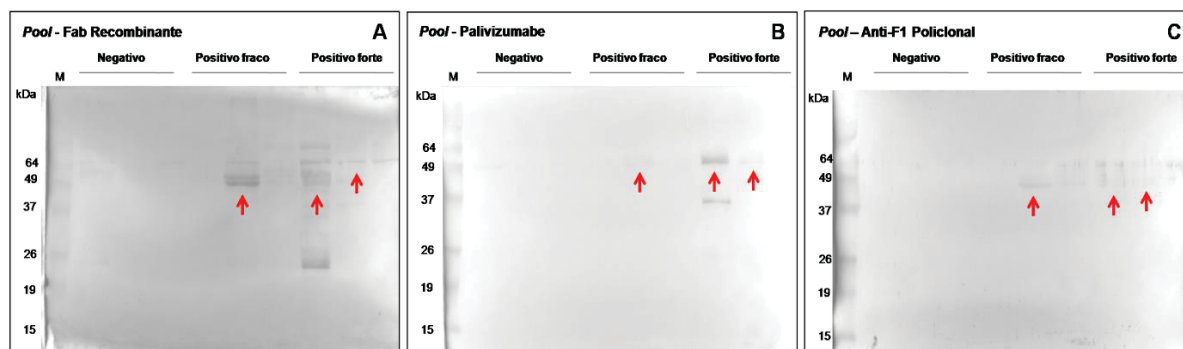
TABELA 12 - MOLÉCULAS SINTÉTICAS DESENVOLVIDAS PARA VALIDAÇÃO NOS IMUNOENSAIOS PARA DIAGNOSTICAR O HRSV

Molécula	Organismo	Conc. (mg/mL)	Qtidade	Tampão armazenamento
RSV-F1	<i>E. coli</i>	~ 0.1	2 mL	PBS pH 7,2; 0,1% Sarcosil; 20%Glicerol
RSV-G	<i>E. coli</i>	~ 0.1	10 mL	PBS pH 7,2; 0,1% Tween-20; 20%Glicerol
RSV-N	<i>E. coli</i>	~0.1	4 mL	PBS pH 7,2; 0,1% Tween-20; 20%Glicerol
Policlonal Anti-F1	Camundongo	-	1 mL	Soro
Policlonal Anti-G	Camundongo	-	2 mL	Soro
Policlonal Anti-N	Camundongo	-	1 mL	Soro
Fab Anti-F	<i>P. pastoris</i>	~1	5 mL	PBS pH 7,2; 0,1% Tween-20; 20%Glicerol
Fab Anti-F-HRP	Conjugado	~0,2	0,5 mL	PBS pH 7,2; 0,1% Tween-20; 30%Glicerol

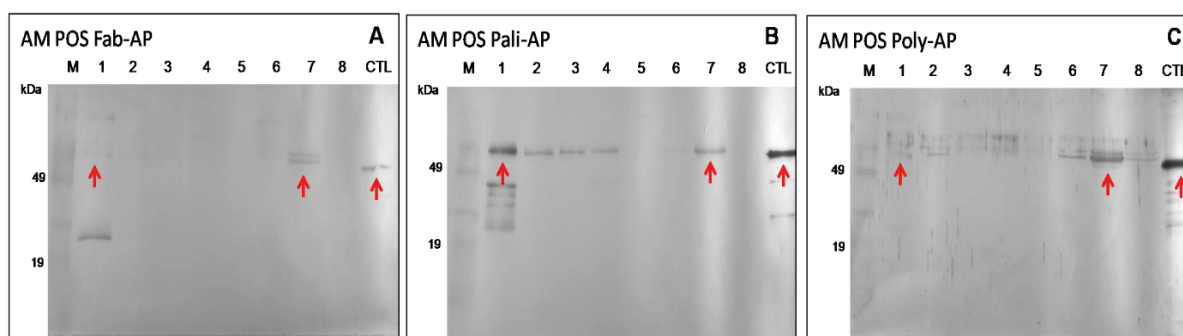
Os resultados negativos aqui obtidos, para os ensaios utilizando as amostras clínicas, provavelmente, estão relacionados ao método de coleta, que não é o mais adequado para os ensaios imunológicos (KIM et al., 2011). Neste tipo de coleta, as amostras impregnadas nos *swabs* são diluídas em tampões específicos para estabilidade de ácidos nucleicos, que pode não ser o mais adequado para os antígenos. Além disso, este tipo de amostra possui baixa carga viral, principalmente em amostras de adultos (SALEZ et al., 2015). Aliado a isto, em todos os ensaios foi realizada uma nova diluição destas amostras (mínimo 1:20), assim como sucessivos congelamentos/descongelamentos. Estes fatos podem ter interferido bruscamente nestes ensaios e provavelmente, a baixa quantidade dos antígenos presentes nestas amostras pode não ter sido suficiente para detecção através dos métodos empregados.

A literatura relata que resultados satisfatórios foram obtidos em imunoensaios quando os antígenos presentes nas amostras clínicas foram precipitados e concentrados (CUI et al., 2013). Porém, pela baixa quantidade de amostra clínica disponível, optamos pela realização dos ensaios de *Western blot*, que permite a separação e concentração dos antígenos através do SDS-PAGE.

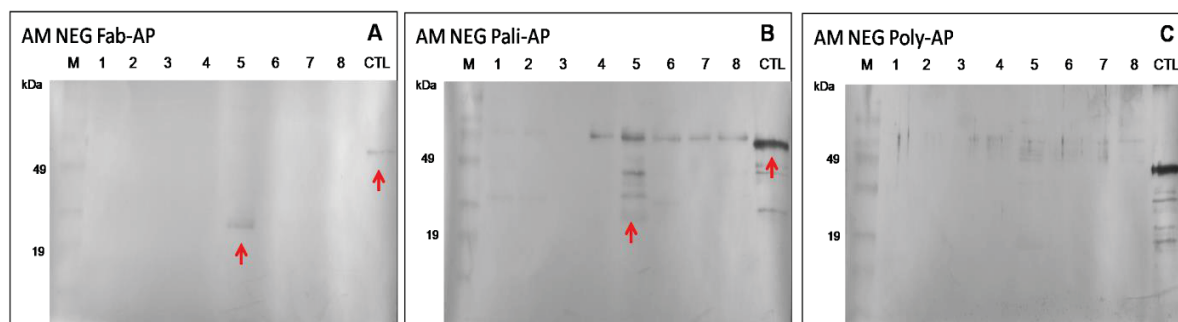
Apesar do epítipo da proteína de fusão do HRSV, reconhecido pelo Palivizumabe, ser dito como conformacional (CORTI et al., 2013, McLELLAN 2015), através do *Western blot* foi possível detectar tanto os antígenos recombinantes (controles positivos), quanto os nativos (amostras clínicas), com todos os anticorpos utilizados neste ensaio (FIGURA 63, 64 e 65). Entretanto, nestas figuras é possível observar também que a intensidade das bandas correspondentes ao fragmento Fab são inferiores ao do Palivizumabe, o que pode estar relacionado ao uso de diferentes quantidades de massas destas moléculas. Além disso, como o fragmento Fab não possui a região Fc, sítio de ligação dos anticorpos anti-IgG conjugados, foi necessário um passo adicional de incubação com anti-FLAG (etiqueta específica presente na cadeia pesada do fragmento Fab), aliado ao fato de que os anticorpos conjugados são de origens diferentes (Anti-IgG camundongo e Anti-IgG humano). Todas estas condições prejudicaram a comparação do desempenho entre os diferentes anticorpos utilizados nestes ensaios (IgG policlonais de camundongos, Palivizumabe e o fragmento Fab recombinante).

FIGURA 63 - ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DOS ANTICORPOS ATRAVÉS DE *WESTERN BLOT*

Nestes ensaios foram utilizadas amostras clínicas coletadas através do *swab* nasofaríngeal de pacientes com sintomas de infecções respiratórias agudas, previamente caracterizadas pelo qRT-PCR. A) Ensaios utilizando o fragmento Fab para detectar os antígenos nativos presentes ou ausentes nas amostras clínicas. B) Ensaios utilizando o anticorpo monoclonal comercial Palivizumabe para detectar os antígenos nativos presentes ou ausentes nas amostras clínicas. C) Ensaios utilizando o anticorpo policlonal anti-F para detectar os antígenos nativos presentes ou ausentes nas amostras clínicas. Negativo, se refere a um *pool* de amostras negativas para infecções respiratórias por qRT-PCR. Positivo fraco se refere a um *pool* de amostras que apresentaram alto CT (28-32). Positivo forte se refere a um *pool* de amostras que apresentaram baixo CT (12-16) no qRT-PCR. M) Marcador de peso molecular pré-corado *Bench Marker*. As setas vermelhas representam a presença da banda de interesse.

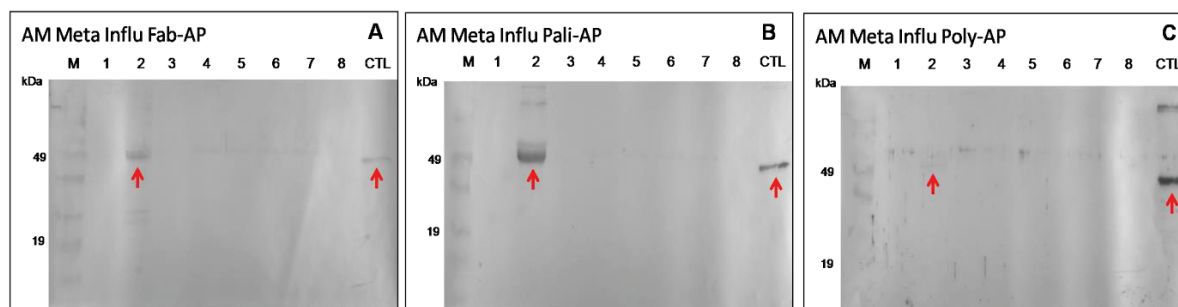
FIGURA 64 - ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DOS ANTICORPOS ATRAVÉS DE *WESTERN BLOT*

Nestes ensaios foram utilizadas amostras clínicas coletadas através do *swab* nasofaríngeal de pacientes com sintomas de infecções respiratórias agudas, previamente caracterizadas pelo qRT-PCR. A) Ensaios utilizando o fragmento Fab para detectar os antígenos nativos presentes nas amostras clínicas. B) Ensaios utilizando o anticorpo monoclonal comercial Palivizumabe para detectar os antígenos nativos presentes nas amostras clínicas. C) Ensaios utilizando o anticorpo policlonal para detectar os antígenos nativos presentes nas amostras clínicas. 1-8) Amostras clínicas diagnosticadas como positivas para o HRSV através do qRT-PCR. CTL) Controle positivo (Antígeno recombinante F1). M) Marcador de peso molecular pré-corado *Bench Marker*. As setas vermelhas representam a presença da banda de interesse.

FIGURA 65 - ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DOS ANTICORPOS ATRAVÉS DE *WESTERN BLOT*

Nestes ensaios foram utilizadas amostras clínicas coletadas através do *swab* nasofaríngeo de pacientes com sintomas de infecções respiratórias agudas, previamente caracterizadas pelo qRT-PCR. A) Ensaios utilizando o fragmento Fab para detectar os antígenos nativos presentes nas amostras clínicas. B) Ensaios utilizando o anticorpo monoclonal comercial Palivizumabe para detectar os antígenos nativos presentes nas amostras clínicas. C) Ensaios utilizando o anticorpo policlonal para detectar os antígenos nativos presentes nas amostras clínicas. 1-8) Amostras clínicas diagnosticadas como negativas para infecções respiratórias virais através do qRT-PCR. CTL) Controle positivo (Antígeno recombinante F1). M) Marcador de peso molecular pré-corado *Bench Marker*. As setas vermelhas representam a presença da banda de interesse.

Detectamos uma amostra positiva para metapneumovírus humano, pelo qRT-PCR, como positiva para HRSV pelo *Western blot*; tanto através do mAb Palivizumabe, quanto através do fragmento Fab (FIGURA 66 A e B) respectivamente), o que não foi observado para o anti-F1 policlonal (FIGURA 66 C). Interessantemente, foram encontradas em literatura evidências de possíveis reações cruzadas entre estes vírus (ZHANG et al., 2017). Verificamos ainda, que algumas amostras caracterizadas como positivas não foram detectadas, enquanto outras, caracterizadas como negativas, foram detectadas (FIGURA 63, 64, 65), sendo mais acentuado nos ensaios utilizando o Palivizumabe. Além disso, pode-se observar padrões de degradação do antígeno F1 das amostras clínicas, quando utilizado tanto o Palivizumabe, quanto o fragmento Fab (FIGURA 64 e 65 A e B), indicando que a instabilidade deste antígeno também pode ter interferido nos resultados.

FIGURA 66 - ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DOS ANTICORPOS ATRAVÉS DE *WESTERN BLOT*

Nestes ensaios foram utilizadas amostras clínicas coletadas através do *swab* nasofaríngeal de pacientes com sintomas de infecções respiratórias agudas, previamente caracterizadas pelo qRT-PCR. A) Ensaios utilizando o fragmento Fab para detectar os antígenos nativos presentes nas amostras clínicas. B) Ensaios utilizando o anticorpo monoclonal comercial Palivizumabe para detectar os antígenos nativos presentes nas amostras clínicas. C) Ensaios utilizando o anticorpo policlonal para detectar os antígenos nativos presentes nas amostras clínicas. 1-4) Amostras clínicas caracterizadas como positivas para o metapneumovírus humano pelo qRT-PCR. 5-8) Amostras clínicas caracterizadas como positivas para o influenza pelo qRT-PCR. CTL) Controle positivo (Antígeno recombinante F1). M) Marcador de peso molecular pré-corado *Bench Marker*. As setas vermelhas representam a presença da banda de interesse.

Estas discrepâncias podem estar relacionadas também às diferenças nas concentrações destes anticorpos, ou na utilização de concentrações não ideais ou ainda, devido a grande heterogeneidade da carga viral presente nas amostras clínicas. Estudos mostraram que anticorpos monoclonais tem uma capacidade limitada para se ligar à proteína alvo em *Western blot*, quando possuem epítomos conformacionais (FORSSTRÖM et al., 2015).

Porém, o mesmo não foi observado, quando utilizado os anticorpos policlonais anti-F, que apesar de apresentarem bandas mais sutis, aparentemente, resultaram em melhor sensibilidade e especificidade em relação aos monoclonais (FIGURA 63C, 64C, 65C, 66C). Uma possível explicação seria o fato de que anticorpos monoclonais humanizados podem ter sua afinidade pelo antígeno afetada em razão do processo de humanização (KARU; BELL; CHIN, 1995), comprometendo a sensibilidade dos ensaios. Entretanto, não foi possível uma comparação mais precisa, já que pelo fato de estar diluído no soro dos camundongos, os anti-HRSV policlonais estão em concentrações diferentes em relação às concentrações do Palivizumabe e do fragmento Fab recombinante. Além disso, pelo fato de serem policlonais, possuem moléculas direcionadas a todos os epítomos do antígeno, ocorrendo uma cobertura mais abrangente em relação aos monoclonais, que interagem com apenas um sítio específico (OIE, 2009; FORSSTRÖM et al., 2015). E ainda, a maioria dos antissoros policlonais contém anticorpos tanto para epítomos lineares como para conformacionais (OIE, 2009).

Como o método de coleta pelo *swab* não é o mais adequado para os imunoensaios, aliado às várias limitações descritas acima, encontramos várias inconsistências em relação as amostras positivas e negativas analisadas pelo LACEN/PR através de qRT-PCR. Por isso, não foi possível realizar as análises de sensibilidade e especificidade dos imunoensaios propostos neste projeto utilizando este painel de amostras clínicas. Com isso, focamos em avaliar o desempenho do

fragmento Fab para detectar os antígenos recombinantes ou nativos (presentes nas amostras clínicas), tendo como referência o anticorpo comercial Palivizumabe, a fim de verificar o potencial desta molécula para o diagnóstico.

O fragmento Fab recombinante, obtido através da expressão *P. pastoris* se mostrou funcional em todos os ensaios realizados, com desempenho semelhante à molécula do anticorpo completa do qual foi originado (FIGURA 63, 64, 65 e 66). Esse fragmento foi capaz de reconhecer tanto os antígenos recombinantes, quanto os antígenos presentes nas amostras clínicas, através dos ensaios de *Western blot* utilizando o *swab* nasofaringeal.

Entretanto, em relação a sensibilidade dos ensaios, a utilização da engenharia de anticorpos para maturação destas moléculas seria extremamente necessária, de modo a aumentar a afinidade desta molécula pelo seu alvo, a fim de detectar as baixas quantidades de proteínas virais, presentes neste tipo de amostra. Sabe-se que o anticorpo Motavizumabe (*Motavizumab*, MEDI-524, *Numax*), derivado do Palivizumabe, foi desenvolvido com um paratopo melhorado de modo a ser uma molécula de altíssima afinidade. Nos ensaios de ELISA, este anticorpo tem mostrando sensibilidade comparável à sensibilidade de ensaios baseados em PCR (BAWAGE et al., 2013). Porém, o teste para comparar a afinidade entre estes anticorpos não foi realizado, uma vez que não foi possível a expressão do fragmento Fab do Motavizumabe.

Os resultados aqui obtidos indicam que os fragmentos de anticorpos podem ser utilizados com sucesso em aplicações diagnósticas, sendo possível, desta forma, obter insumos para o diagnóstico do HRSV através de sistemas mais acessíveis de produção, com alto rendimento e baixo custo quando comparados com outros sistemas de expressão eucarioto.

Através dos imunoenaios foi possível constatar que às características e qualidade da amostra clínica, assim como os alvos selecionados para o desenvolvimento dos anticorpos monoclonais de captura, interferiram diretamente nos resultados para detecção do HRSV, através dos métodos aqui adotados, ressaltando a importância no desenvolvimento de moléculas mais sensíveis e específicas. De fato, as principais limitações dos imunodiagnósticos para o HRSV são os falsos positivos provenientes de reações cruzadas com proteínas de outros vírus, as quais possuem relativa similaridade e os falsos negativos que na maioria dos casos é devido à alta variação da população viral. Os falsos negativos estão

também associados à grande heterogeneidade das amostras clínicas (COLLINS; POLLARD, 2002), sendo que a carga viral é alta em crianças e muito baixa em adultos (KIM et al., 2011; SALEZ et al., 2015).

Posteriormente, devido a discrepância referentes a caracterização de amostras positivas e/ou negativas para o HRSV e outros vírus respiratórios, entre o qRT-PCR realizado pelo LACEN/PR e os imunoensaios por nós realizados, foi necessário realizar um estudo sobre as características genéticas do HRSV. Com isso, levou-se em conta sua conservação com outros vírus ou a alta variabilidade dentro de seus subgrupos, a fim de certificar se os antígenos e anticorpos por nós utilizados seriam os mais adequados ao imunodiagnóstico do HRSV e quais seriam as regiões mais indicadas para este método de diagnóstico. Estas análises foram utilizadas para elaboração do manuscrito "*In silico analysis of amino acid variation in human respiratory syncytial virus: insights into immunodiagnosics*" (ANEXO 3), cujos resultados estão apresentados no item abaixo (4.5).

4.5 VARIABILIDADE GENÉTICA DO HRSV APLICADA AO IMUNODIAGNOSTICO

Um dos principais problemas da utilização de proteínas recombinantes nos imunoensaios é a identificação de antígenos ou fragmentos mais adequados e úteis no diagnóstico (VORNHAGEN et al., 1992) e obtenção das proteínas com dobramento semelhante às nativas (OIE, 2009). As características gênicas são um dos fatores críticos para assegurar a sensibilidade ótima de qualquer ensaio de diagnóstico, através da identificação de sequências que são altamente conservadas entre os vários isolados e tipos do organismo alvo (WHILEY et al., 2002).

A pesquisa de alvos para o imunodiagnóstico do HRSV deve considerar a variação genética da proteína alvo, bem como a similaridade com proteínas de outros vírus respiratórios, de forma a incluir ou excluir determinadas regiões. Estas regiões, provavelmente são as que mais coincidem também para o desenvolvimento de vacinas e anticorpos terapêuticos. É importante salientar que as análises da variabilidade de aminoácidos do HRSV, assim como a presença de regiões conservadas com outros vírus respiratórios humanos, aqui descritas, foram realizadas utilizando apenas o alinhamento linear de sequências de aminoácidos. Para o desenvolvimento de antígenos ou anticorpos específicos para o HRSV, é

necessário também, realizar estudos de mapeamento de epítomos e análise estrutural das regiões alvos. Todas as figuras estão presentes no manuscrito (ANEXO 3).

De acordo com a nossa análise da variabilidade genética do HRSV, constatamos que este vírus apresenta proteínas com diferentes níveis de variação genética, sendo a proteína N extremamente conservada, a proteína F mostrando variação intermediária e a proteína G com regiões altamente variáveis.

A conservação da proteína N não se restringe aos genomas de HRSV e apresenta uma semelhança considerável com a proteína N do metapneumovírus humano, principalmente do aa160 C-terminal até o final da sequência (LIU et al., 2014), implicando em possíveis reações cruzadas, assim como os 31 primeiros aminoácidos desta proteína (ZHANG et al., 2015). Consequentemente, estas regiões não são apropriadas para o diagnóstico do HRSV, ao passo que os anticorpos monoclonais contra a região N-terminal, a partir dos aminoácidos 30-160, podem ser utilizados, uma vez que são conservados apenas entre as sequências deste vírus (ZHANG et al., 2015). A proteína N é a mais desejável para fins terapêuticos e vacinais (LEONOVA et al., 1998, TERROSI et al., 2007) por ser altamente imunogênica, sendo o maior alvo para a resposta citotóxica das células T humana. Além disso, quando utilizada em conjunto com as proteínas de superfície do vírus, induz respostas protetoras (PIERANTONI et al., 2015; JORQUERA et al., 2016). Uma vez que a proteína N é essencial para a replicação de HRSV, os anticorpos contra esta proteína podem potencialmente inibir a replicação viral de uma forma mais eficiente que os anticorpos contra as proteínas F e G que apenas inibem a entrada do vírus nas células hospedeiras (MELERO, 2007).

A proteína F compartilha similaridade estrutural com as proteínas F de outros vírus *Mononegavirales* (MELERO et al., 2017). No entanto, como pode ser visto a partir de nossos resultados de alinhamento, exceto para metapneumovírus humano, a similaridade linear de aminoácidos fica limitada a regiões muito curtas. No entanto, os anticorpos policlonais contra a proteína F de HRSV podem produzir reatividade cruzada com estes outros vírus e devem ser evitados para fins de diagnósticos específicos. Identificamos apenas duas regiões curtas da proteína F de HRSV (aa 97-109 da F2 e aa 417-428 da F1) que são altamente divergentes em relação a estes outros vírus e podem ser utilizadas para o desenvolvimento de mAbs, para evitar reações cruzadas. Além disso, outras regiões menos divergentes podem ser

consideradas para mAbs, contudo devem ser selecionadas com precaução, uma vez que os aminoácidos descontínuos podem formar epítomos conformacionais, os quais tem maiores possibilidades de reação cruzada. O epítopo da proteína de fusão do HRSV que é reconhecido pelo Palivizumabe, possui um domínio *helix-loop-helix* com resíduos descontínuos dentro de um peptídeo linear de 20 resíduos, sendo mais passível às reações cruzadas nesta região (CORTI et al., 2013, McLELLAN 2015).

A divergência média de sequência para a proteína G entre os grupos de HRSV encontrados neste trabalho foi de 47,8%, semelhante aos valores descritos em estudos anteriores (JOHNSON et al., 1987, MELERO et al., 1997, SULLENDER 2000). A partir de um grande número de sequências isoladas em todo o mundo, a proteína G tornou-se um sistema modelo para estudos de epidemiologia e evolução de patógenos (CANE, 2007). A aparição de novos genótipos pode ajudar o HRSV a escapar da imunidade adquirida de infecções anteriores e também pode influenciar a gravidade das infecções e causar novos surtos (CUI et al., 2013).

A alta capacidade da proteína G abrigar longas inserções sem afetar sua função está relacionada à flexibilidade estrutural dos domínios HVR, que permitem mudanças evolutivas rápidas, o que contribui para a patogenicidade do HRSV (MOURA et al., 2013). Alterações nestes domínios podem alterar o padrão de glicosilação, alterando as propriedades antigénicas virais (CUI et al., 2013). Essas regiões não são, portanto, alvos adequados para prevenção (TAN et al., 2013) e diagnóstico. Em contraste, observamos em nossa análise, que a região central conservada 13-aa é idêntica em todos os genótipos analisados, sendo um excelente alvo para o diagnóstico e prevenção. De fato, os anticorpos monoclonais contra esta região foram bem-sucedidos contra a infecção e doença por HRSV (JORQUERA et al., 2016). Adicionalmente, a ausência de semelhança linear e estrutural da proteína G de HRSV com outras proteínas de ligação de vírus *Mononegavirales* (MELERO et al., 1997) evita reações cruzadas.

Em nossas análises, destacamos as sequências alvo das proteínas N, F e G que apresentam maior potencial para o diagnóstico de HRSV. Sugerimos que a região central conservada da proteína G e as regiões específicas descritas acima das proteínas F e N sejam as mais adequadas para o desenvolvimento de anticorpos para aplicações em diagnósticos e devem ser utilizadas em conjunto para dar maior cobertura e precisão ao teste. Anticorpos gerados contra estas regiões alvos,

poderão ser utilizados em muitos tipos de testes de diagnóstico baseados na captura de partículas virais, que são recomendadas para a fase aguda da infecção.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- a) Foi possível expressar todas as proteínas recombinantes, propostas para este projeto, em *E. coli*. As proteínas HRSV-G do envelope viral e a proteína HRSV-N do nucleocapsídeo foram expressas e purificadas da fração solúvel com êxito, já a proteína HRSV-F1 foi solubilizada e purificada a partir de corpos de inclusão, através de tampão otimizado para remoção de proteínas contaminantes de *E. coli*. Através deste tampão, foi possível também, a solubilização das proteínas HRSV-F2 e do fragmento HRSV-F1. Ensaios baseados em captura de anticorpos, porém, não foram explorados pelo fato do diagnóstico de doenças respiratórias ser relevante no momento da infecção ativa quando ainda não há níveis de anticorpos no soro ou secreções para detecção. Apesar do baixo rendimento, os antígenos foram usados satisfatoriamente como controles positivos nos imunoenaios de captura;
- b) Os antígenos recombinantes produzidos em *E. coli* se mostraram imunogênicos, pois foi possível a obtenção de anticorpos policlonais específicos contra as proteínas HRSV-F1, HRSV-G e HRSV-N através da imunização de camundongos com estes antígenos;
- c) Os genes codificantes da cadeia leve e cadeia pesada dos fragmentos Fabs do Palivizumabe e do Motavizumabe foram amplificados e subclonados com sucesso nos vetores para expressão em *Pichia pastoris*. Foi possível a expressão e purificação do fragmento Fab do anticorpo Palivizumabe, com bom rendimento. Esse fragmento se mostrou de forma funcional, de acordo com os ensaios de interação e imunológicos. Nestes ensaios, este fragmento foi capaz de detectar tanto o antígeno recombinante quanto o antígeno nativo nas amostras clínicas de modo semelhante as moléculas completas;
- d) Os antígenos presentes nas amostras clínicas coletadas através de *swab* provavelmente encontravam-se altamente diluídos e com padrões de degradação, de forma que não foi possível diferenciar amostras positivas de negativas nos ensaios de ELISA e *Luminex*, utilizando tanto os anticorpos policlonais, quanto o Palivizumabe e o fragmento Fab recombinante;
- e) Através de *Western blot*, utilizando os anticorpos policlonais, Palivizumabe e o fragmento Fab, foi possível detectar os antígenos quando presentes nas amostras clínicas. Porém provavelmente devido ao método de coleta de amostra

- clínica não ser o mais indicado para imunoensaios, houve discrepância entre amostras positivas e negativas previamente caracterizadas através de qRT-PCR;
- f) Com base nas análises das sequências de aminoácidos das proteínas do HRSV, constatou-se que este vírus apresenta diferentes níveis de variação genética, com a proteína N sendo extremamente conservada, a proteína F mostrando variação intermediária e a proteína G contendo regiões altamente variáveis. As proteínas F e G possuem algumas regiões curtas conservadas com outros vírus da ordem *Mononegavirales*, apresentando maior similaridade com o metapneumovírus humano. Já a proteína G não apresentou similaridade com nenhum outro vírus humano, em contrapartida, apresentou divergência até mesmo entre as sequências do mesmo genótipo. Sugerimos que a região central conservada da proteína G e regiões curtas e específicas das proteínas F e N são as mais adequadas para o desenvolvimento de anticorpos para aplicações diagnósticas. Os anticorpos contra estas sequências alvo podem ser utilizados em muitos tipos de testes de diagnóstico baseados na captura e detecção das partículas virais, que são recomendadas para a fase aguda da infecção;
- g) Quanto às limitações dos imunodiagnósticos, em relação as informações aqui obtidas, recomendamos uma análise cautelosa das regiões de cada proteína a ser utilizada, em relação a variabilidade genética ou similaridade com outros vírus respiratórios, tanto da sequência linear, quanto da estrutural, de modo a aumentar a sensibilidade e especificidade do teste e evitar reações cruzadas. Recomendamos também a utilização de regiões alvos das três proteínas (F1, G e N) em conjunto de modo a dar maior cobertura para detectar as variantes do HRSV em todas as etapas do ciclo viral.

O *swab* por ser um método não invasivo, é muito utilizado, especialmente em crianças, que é um grupo vulnerável. Porém, não parece ser o método indicado para imunodiagnóstico, já que os antígenos podem estar em concentração subótima para sua detecção, de acordo com a carga viral do paciente, impactando na baixa sensibilidade do teste. Tendo em vista que um teste de diagnóstico eficaz deve ser otimizado de acordo com o método de coleta mais adequado ao paciente, recomendamos fortemente concentrar a amostra clínica proveniente deste método por precipitação em tampão adequado; além disso, sugerimos a utilização de anticorpos com alta afinidade para os alvos. Acreditamos que deste modo seria

possível obter moléculas capaz de detectar a infecção assim que os primeiros sintomas aparecerem, podendo ser utilizada nas várias plataformas do imunodiagnóstico, com sensibilidade e especificidade mais próximas às dos testes moleculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, C. L. et al. Taxonomy of the order *Mononegavirales*: update 2016. **Archives of Virology**, v. 161, n. 8, p. 2351–2360, 2016.
- AKHTER, J.; JOHANI, S. AL. Epidemiology and diagnosis of human respiratory syncytial virus infections. In: RESCH, B. **Human Respiratory Syncytial Virus Infection**. Rijeka: InTech, 2011. p. 161-176.
- AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. Antibody purification. p. 5–13, 2002.
- ARCURI, H. A. et al. Expression and purification of human respiratory syncytial virus recombinant fusion protein. **Protein Expression and Purification**, v. 62, n. 2, p. 146–152, 2008.
- ASENJO, A. et al. Phosphorylation of the human respiratory syncytial virus N protein provokes a decrease in viral RNA synthesis. **Virus research**, v. 163, n. 1, p. 396–400, jan. 2012.
- BATONICK, M.; WERTZ, G. W. Requirements for human respiratory syncytial virus glycoproteins in assembly and egress from infected cells. **Advances in Virology**, v. 2011, 2011.
- BAWAGE, S. S. et al. Recent advances in diagnosis, prevention, and treatment of human respiratory syncytial virus. **Advances in Virology**, v. 2013, p. 5957-68, 2013.
- BEELE, J. A.; EICHELBERGER, M. C. Influenza and respiratory syncytial virus (RSV) vaccines for infants: safety, immunogenicity, and efficacy. **Microbial pathogenesis**, v. 55, p. 9–15, 2013.
- BHELLA, D. et al. Significant differences in nucleocapsid morphology within the *Paramyxoviridae*. **The Journal of general virology**, v. 83, n. 2002, p. 1831–1839, 2002.
- BOTOSSO, V. F. et al. Positive selection results in frequent reversible amino acid replacements in the G protein gene of human respiratory syncytial virus. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 1, 2009.
- BRANIGAN, P. J. et al. Use of a novel cell-based fusion reporter assay to explore the host range of human respiratory syncytial virus F protein. **Virology journal**, v. 2, p. 54, 2005.
- BRENDISH, N. J.; SCHIFF, H. F.; CLARK, T. W. Point-of-care testing for respiratory viruses in adults : The current landscape and future potential. **Journal of Infection**, v. 71, n. 5, p. 501–510, 2015.

BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (imac) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 5, 1288-1296, 2009.

BRUNING, A. H. L. et al. Evaluation of a rapid antigen detection point-of-care test for respiratory syncytial virus and influenza in a pediatric hospitalized population in the Netherlands. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 80, n. 4, p. 292–293, 2014.

BURAPHACHEEP, W.; BRITT, W. J.; SULLENDER, W. M. Detection of antibodies to respiratory syncytial virus attachment and nucleocapsid proteins with recombinant baculovirus-expressed antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 354–357, 1997.

CAMPBELL, H.; BONT, L.; NAIR, H. Respiratory syncytial virus (RSV) disease – new data needed to guide future policy. **Journal of Global Health**, v. 5, n. 2, p. 1–3, 2015.

CANE, P. Molecular epidemiology and evolution of RSV. In: CANE, P. **Respiratory syncytial virus**. Amsterdam: Elsevier, 2007. P. 89–114.

CASTAGNÉ, N. et al. Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 6, p. 1643–1653, 2004.

CHARTRAND, C.; TREMBLAY, N.; RENAUD, C. Diagnostic accuracy of rapid antigen detection tests for respiratory syncytial virus infection : systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 3738–3749, 2015.

CLARK, A. et al. **Guidelines on: antibody production**. 2002.

COLLINS, C. L.; POLLARD, A. J. Respiratory syncytial virus infections in children and adults. **Journal of Infection**, v. 45, n. 1, p. 10–17, 2002.

COLLINS, P. L.; GRAHAM, B. S. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 82, n. 5, p. 2040–2055, 2008.

CORTI, D. et al. Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 439–443, 2013.

CUI, G. et al. Genetic variation in attachment glycoprotein genes of human respiratory syncytial virus subgroups A and B in children in recent five consecutive years. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–12, 2013.

CURRAN, J.; MARQ, J. B.; KOLAKOFSKY, D. An N-terminal domain of the Sendai paramyxovirus P protein acts as a chaperone for the NP protein during the nascent chain assembly step of genome replication. **The Journal of Virology**, v. 69, n. 2, p. 849, 1995.

DA CUNHA, E. S.; DOMINGUES, C. C.; DE PAULA, E. Modified native electrophoresis protocol for the solubilization and separation of mitochondrial protein complexes. **Analytical Biochemistry**, v. 418, n. 1, p. 158–160, 2011.

DALL'AGNOLA, A.; GIRARDI, E.; BEGHINI, R. The guidelines for the prophylaxis of RSV: the need to upgrade. **Early Human Development**, v. 89, n. SUPPL4, p. S91–S93, 2013.

DAY, N. D. et al. Contribution of cysteine residues in the extracellular domain of the F protein of human respiratory syncytial virus to its function. **Virology journal**, v. 3, p. 34, 2006.

DE-PARIS, F. et al. Evaluation of respiratory syncytial virus group A and B genotypes among nosocomial and community-acquired pediatric infections in southern Brazil. **Virology journal**, v. 11, p. 36, 2014.

DOERNER, A. et al. Therapeutic antibody engineering by high efficiency cell screening. **FEBS Letters**, v. 588, n. 2, p. 278–287, 2014.

DUNBAR, S. A. et al. Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system. **Journal of Microbiological Methods**, v. 53, n. 2, p. 245–252, 2003.

EARL, C. S.; AN, S. QI; RYAN, R. P. The changing face of asthma and its relation with microbes. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 7, p. 408–418, 2015.

EILAND, L. S. Respiratory syncytial virus: diagnosis, treatment and prevention. **The journal of pediatric pharmacology and therapeutics**, v. 14, n. 2, p. 75–85, 2009.

ESPOSITO, S. et al. Evaluation of a multiplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of influenza and respiratory syncytial viruses. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 84, n. 1, p. 40–42, 2016a.

ESPOSITO, S. et al. Partial comparison of the NxTAG respiratory pathogen panel assay with the Luminex xTAG respiratory panel fast assay V2 and singleplex real-time polymerase chain reaction for detection of respiratory pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 86, n. 1, p. 53–57, 2016b.

FORSSTRÖM, B. et al. Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–11, 2015.

FRENZEL, A.; HUST, M.; SCHIRRMANN, T. Expression of recombinant antibodies. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 1–20, 2013.

GAUNT, E. R. et al. Molecular epidemiology and evolution of human respiratory syncytial virus and human metapneumovirus. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e17427, 2011.
GINOCCHIO, C. C.; MCADAM, A. J. Current best practices for respiratory virus testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 9 SUPPL., p. 44–48, 2011.

GRANDIN, C. et al. Evidence for an intranasal immune response to human respiratory syncytial virus infection in cynomolgus macaques. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 4, p. 782–792, 2015.

HACKING, D.; HULL, J. Respiratory syncytial virus - Viral biology and the host response. **Journal of Infection**, v. 45, n. 1, p. 18–24, 2002.

HALL, C. B. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. **English Journal**, v. 344, n. 25, p. 1917–1928, 2001.

HANDFORTH, J.; FRIEDLAND, J. S.; SHARLAND, M. Basic epidemiology and immunopathology of RSV in children. **Paediatric respiratory reviews**, v. 1, n. 3, p. 210–214, 2000.

HANNIG, G; MAKRIDES, S.C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. **Trends in Biotechnology**, v.16, p. 54-60, 1998.

HOLLIGER, P.; HUDSON, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nature biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 1126–1136, 2005.

HU, P. et al. Alternate circulation and genetic variation of human respiratory syncytial virus genotypes in Chengdu, West China, 2009-2014. **Journal of medical virology**, v. 89, n. 1, p. 32–40, 2017.

INAGAKI, K. et al. Correlation between the interval of influenza virus infectivity and results of diagnostic assays in a ferret model. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 3, p. 407–410, 2016.

INVITROGEN. Pichia expression vectors for selection on ZeocinTM and purification of secreted, recombinant proteins. **Life Technologies**, n. 25, p. 48, 2010a.

INVITROGEN. BL21 StarTM (DE3). **Life Technologies**, n. 25, p. 24, 2010b.

JHAMB, K.; SAHOO, D. K. Production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*: Effects of process conditions and chaperone co-expression on cell growth and production of xylanase. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 135–143, 2012.

JOHNSON, P. R. et al. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 16, p. 5625–9, 1987.

JOHNSON, P. R.; COLLINS, P. L. The fusion glycoproteins of human respiratory syncytial virus of subgroups A and B: sequence conservation provides a structural basis for antigenic relatedness. **Journal of general virology**, v. 69, p. 2623–28, 1988.

JOHNSTONE, C. et al. Shifting immunodominance pattern of two cytotoxic T-lymphocyte epitopes in the F glycoprotein of the long strain of respiratory syncytial virus. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 11, p. 3229–3238, 2004.

JONCKHEERE, S. et al. Multicenter evaluation of BD Veritor System and RSV K-SeT for rapid detection of respiratory syncytial virus in a diagnostic laboratory setting. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 83, n. 1, p. 37–40, 2015.

KARU, A. E.; BELL, C. W.; CHIN, T. E. Recombinant antibody technology. **ILAR Journal**, v. 37, n. 3, p. 132–141, 1995.

KATZOV-ECKERT, H. et al. Phylodynamics and dispersal of HRSV entails its permanence in the general population in between yearly outbreaks in children. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–11, 2012.

KIM, C. et al. Comparison of nasopharyngeal and oropharyngeal swabs for the diagnosis of eight respiratory viruses by real-time reverse transcription-PCR assays. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. 2–7, 2011.

KOLIASNIKOV, O. V et al. Recombinant production of horseradish peroxidase conjugates with Fab antibodies in *Pichia pastoris* for analytical applications. **Acta naturae**, v. 3, n. 3, p. 85–92, 2011.

KOO, B. et al. Biosensors and bioelectronics assay for diagnosis of respiratory viral infections. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 90, p. 187–194, 2017.

KOSAKA, I. M. et al. Construction of adenoviral vectors expressing F and G glycoproteins of Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 1–2, p. 167–172, 2004.

LABORATÓRIO CENTRAL DO ESTADO DO PARANÁ. Manual de coleta e envio de amostras biológicas ao LACEN/PR. 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LANGE, S.; SCHMITT, J.; SCHMID, R. D. High-yield expression of the recombinant, atrazine-specific Fab fragment K411B by the methylo-trophic yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Immunological Methods**, v. 255, p. 103–114, 2001.

LAY, M. K. et al. Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response. **Microbes and Infection**, v. 15, n. 3, p. 230–242, 2013.

LEBENDIKER, M.; DANIELI, T. Production of prone-to-aggregate proteins. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 588, n. 2, p. 236–246, 2014.

LEE, H. S. et al. Expression and antigenicity of recombinant human respiratory syncytial virus glycoproteins having different affinity tags. **Protein Expression and Purification**, v. 132, p. 1–8, 2017.

LEONARDI, G. P. et al. Evaluation of respiratory syncytial virus (RSV) direct antigen detection assays for use in point-of-care testing. **Journal of Virological Methods**, v. 213, p. 131–134, 2015.

LEONOVA, I. V. et al. Development of human antibodies against linear antigenic and immunogenic regions of respiratory syncytial virus (RSV) nucleocapsid and phospho- proteins shows the site-directed characteristics. **Journal of Clinical Virology**, v. 11, n. 2, p. 137–147, 1998.

LEVELY, M. E. et al. Immunodominant T-cell epitope on the F protein of respiratory syncytial virus recognized by human lymphocytes. **Journal of virology**, v. 65, n. 7, p. 3789–3796, 1991.

LIMA, H. N. et al. Molecular epidemiology of the SH (small hydrophobic) gene of human respiratory syncytial virus (HRSV), over 2 consecutive years. **Virus research**, v. 163, n. 1, p. 82–6, 2012.

LIU, J. et al. Genetic variation of human respiratory syncytial virus among children with fever and respiratory symptoms in Shanghai, China, from 2009 to 2012. **Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 27C, p. 131–136, 2014.

MAZUR, N. I. et al. Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus: Current management and new therapeutics. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 3, n. 11, p. 888–900, 2015.

MCLELLAN, J. S. et al. Structure of a major antigenic site on the respiratory syncytial virus fusion glycoprotein in complex with neutralizing antibody 101F. **Journal of virology**, v. 84, n. 23, p. 12236–12244, 2010.

MCLELLAN, J. S.; RAY, W. C.; PEEPLES, M. E. Structure and function of RSV surface glycoproteins. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 372, p. 83–104, 2013.

MCLELLAN, J. S. Neutralizing epitopes on the respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. **Current Opinion in Virology**, v. 11, p. 70–75, 2015.

MEJIAS, A.; RAMILO, O. New options in the treatment of respiratory syncytial virus disease. **Journal of Infection**, v. 71, n. S1, p. S80–S87, 2015.

MELERO, J.A. et al. Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. **Journal of general virology**, v. 78, n. 10, p. 2411–8, 1997.

MELERO, J.A. Molecular biology of human respiratory syncytial virus. In: Cane P, **Respiratory syncytial virus**. Amsterdam: Elsevier, 2007. 1–42.

MELERO, J.A.; MAS, V.; MCLELLAN, J. S. Structural, antigenic and immunogenic features of respiratory syncytial virus glycoproteins relevant for vaccine development. **Vaccine**, v. 35, n. 3, p. 461-468, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. 2012.

MONEY, V. A et al. Surface features of a *Mononegavirales* matrix protein indicate sites of membrane interaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 11, p. 4441-6, 2009.

MOURA, F. E. A. et al. Respiratory syncytial virus epidemic periods in an equatorial city of Brazil. **Influenza and other Respiratory Viruses**, v. 7, n. 6, p. 1128-1135, 2013.

MUFSON, M. A. et al. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. **The Journal of general virology**, v. 66, Pt 10, p. 2111-2124, 1985.

MURBY, M. et al. Hydrophobicity engineering to increase solubility and stability of a recombinant protein from respiratory syncytial virus. **European Journal of Biochemistry**, v. 230, n. 1, p. 38-44, 1995.

NAIR, H. et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 375, n. 9725, p. 1545-1555, 2010.

NOVAGEN. pET System Manual Novagen. **Biosystems**, p. 1-68, 2003.

OIE. Biotechnology in the diagnosis of infectious diseases and vaccine development. **Africa**, n. 138, p. 1-25, 2009.

PEELING, R. W.; OLLIARO, P. Reimagining the future of the diagnosis of viral infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 6, p. 828-829, 2016.

PICHÉ-RENAUD, P. P. et al. Evaluation of a fluorescent immunoassay rapid test (Sofia™) for detection of influenza A + B and RSV in a tertiary pediatric setting. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 84, n. 4, p. 304-308, 2016.

PIEDIMONTE, G. RSV infections: State of the art. **Cleveland Clinic journal of medicine**, v. 82, n. 11 Suppl 1, p. S13-8, 2015.

PIEDIMONTE, G.; PEREZ, M. K. Respiratory syncytial virus infection and bronchiolitis. **Pediatrics in review / American Academy of Pediatrics**, v. 35, n. 12, p. 519-30, 2014.

PIERANTONI, A. et al. Mucosal delivery of a vectored RSV vaccine is safe and elicits protective immunity in rodents and nonhuman primates. **Molecular therapy. Methods & clinical development**, v. 2, n. February, p. 15018, 2015.

POLACK, F. P. The changing landscape of respiratory syncytial virus. **Vaccine**, v. 33, n. 47, p. 6473–6478, 2015.

POPOW-KRAUPP, T.; ABERLE, J. H. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection. **The open microbiology journal**, v. 5, p. 128–34, 2011.

PRENDERGAST, C.; PAPENBURG, J. Rapid antigen-based testing for respiratory syncytial virus: moving diagnostics from bench to bedside? **Future microbiology**, v. 8, n. 4, p. 435–44, 2013.

PRETORIUS, M. A. et al. Replacement and positive evolution of subtype A and B respiratory syncytial virus G-protein genotypes from 1997–2012 in South Africa. **Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. SUPPL. 3, p. 227–237, 2013.

RODRIGUEZ, R.; RAMILO, O. Respiratory syncytial virus: How, why and what to do. **Journal of Infection**, v. 68, n. SUPPL1, p. S115–S118, 2014.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. APR, p. 1–17, 2014.

SALEZ, N. et al. Evaluation of four commercial multiplex molecular tests for the diagnosis of acute respiratory infections. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0130378, 2015.

SALTER, A.; LAOI, B. N.; CROWLEY, B. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus subgroups A and B identified in adults with hematological malignancy attending an Irish hospital between 2004 and 2009. **Journal of medical virology**, v. 83, n. 2, p. 337–47, 2011.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3-Volume set. New York: Cold Spring Harboc, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24532655>>

SAWADA, A.; KOMASE, K.; NAKAYAMA, T. AIK-C measles vaccine expressing fusion protein of respiratory syncytial virus induces protective antibodies in cotton rats. **Vaccine**, v. 29, n. 7, p. 1481–1490, 2011.

SCHLAGER, B.; STRAESSLE, A.; HAFEN, E. Use of anionic denaturing detergents to purify insoluble proteins after overexpression. **BMC biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 95, 2012.

SINGH, S. R. et al. Immunogenicity and efficacy of recombinant RSV-F vaccine in a mouse model. **Vaccine**, v. 25, n. 33, p. 6211–23, 2007.

SINGH, A. et al. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. **Microbial Cell Factories**, v. 14, p. 41, 2015.

SMITH, B. J.; LAWRENCE, M. C.; COLMAN, P. M. Modelling the structure of the fusion protein from human respiratory syncytial virus. **Protein engineering**, v. 15, n. 5, p. 365–71, 2002.

SOUZA, C. et al. In silico analysis of amino acid variation in human respiratory syncytial virus : insights into immunodiagnostics. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, p. 1–9, 2017.

SPIRO, A.; LOWE, M.; BROWN, D. A bead-based method for multiplexed identification and quantitation of DNA sequences using flow cytometry. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4258–65, 2000.

STOCKTON, J. et al. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 10, p. 2990–5, 1998.

SULLENDER, W. M. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 1-15, 2000.

TAN, L. et al. The comparative genomics of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: genetic variability and molecular evolutionary dynamics. **Journal of virology**, v. 87, n. 14, p. 8213–26, 2013.

TERROSI, C. et al. Immunological characterization of respiratory syncytial virus N protein epitopes recognized by human cytotoxic T lymphocytes. **Viral immunology**, v. 20, n. 3, p. 399–406, 2007.

TRAN, T. L. et al. The nine C-terminal amino acids of the respiratory syncytial virus protein P are necessary and sufficient for binding to ribonucleoprotein complexes in which six ribonucleotides are contacted per N protein promoter. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 1, p. 196–206, 2007.

VAN BLEEK, G. M. et al. Identification of immunodominant epitopes derived from the respiratory syncytial virus fusion protein that are recognized by human CD4 T cells. **Journal of virology**, v. 77, n. 2, p. 980–8, 2003.

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; WATKISS, E. R. Pathogenesis of respiratory syncytial virus. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 3, p. 300–305, 2012.

VAN REMMERDEN, Y. et al. An improved respiratory syncytial virus neutralization assay based on the detection of green fluorescent protein expression and automated plaque counting. **Virology journal**, v. 9, p. 253, 2012.

VASINA, J. A.; BANEYX, F. Expression of aggregation-prone recombinant proteins at low temperatures: a comparative study of the *Escherichia coli* cspA and tac promoter systems. **Protein Expression and Purification**, v. 9, n. 2, p. 211–218, 1997.

VIGNALI, D. A. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. **Journal of immunological methods**, v. 243, n. 1–2, p. 243–55, 2000.

VORNHAGEN, R. et al. Recombinant antigens in viral diagnosis. In: KARGER, B. **Transfusionsmedizin**. v. 30, n. 2, p. 78–81, 1992.

WARNES, A.; FOOKS, A. R.; STEPHENSON, J. R. Design and preparation of recombinant antigens as diagnostic reagents in solid-phase immunosorbent assays. **Methods in molecular medicine**, v. 94, p. 373–91, 2004.

WELLS, P. A. et al. Purification of a recombinant human respiratory syncytial virus chimeric glycoprotein using reversed-phase chromatography and protein refolding in guanidine hydrochloride. **Protein Expression and Purification**, v. 5, p. 391–401, 1994.

WERTZ, G. W. et al. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 12, p. 4075–9, 1985.

WHILEY, D. M. et al. Detection of human respiratory syncytial virus in respiratory samples by light cycler reverse transcriptase PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 12, p. 4418–4422, 2002.

WU, W. et al. Different NF- κ B activation characteristics of human respiratory syncytial virus subgroups A and B. **Microbial pathogenesis**, v. 52, n. 3, p. 184–91, 2012.

ZHANG, Y. et al. A duplex recombinant viral nucleoprotein microbead immunoassay for simultaneous detection of seroresponses to human respiratory syncytial virus and metapneumovirus infections. **Journal of Virological Methods**, v. 206, p. 55–62, 2014.

ZHANG, Y. et al. Serologic cross-reactions between nucleocapsid proteins of human respiratory syncytial virus and human metapneumovirus. **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1609–15, 2015.

ZHANG, Y. et al. Serology enhances molecular diagnosis of respiratory virus infections other than influenza in children and adults hospitalized with community-acquired pneumonia. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 1, p. 79–89, 2017.

ZHENG, Y. et al. Prevailing genotype distribution and characteristics of human respiratory syncytial virus in northeastern China. **Journal of medical virology**, v. 89, n. 2, p. 222–233, 2017.

ZLATEVA, K. T. et al. Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. **Journal of virology**, v. 79, n.14, p. 9157, 2005.

ANEXO 1

LAVAGEM E SOLUBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DOS CORPOS DE INCLUSÃO DE *E. COLI*

1. Lise das células

Tampão

50 mM CAPS pH 11
15% Glicerol
10 mM DTT
5 mM EDTA
1 mM PMSF

Procedimento

- Descongelar as células e ressuspendê-las em 5 mL/g de células no tampão de lise;
- Adicionar 200 µg/mL de lisozima e incubar a 30°C por 15 minutos sob rotação baixa;
- Sonicar 6x 20" amplitude 30% (para volume de 15-30 mL) ou 6x 10" para volumes menores de 15 mL, com intervalos de 45" entre os ciclos de sonicação;
- Centrifugar 15' 10.000 xg, 4°C;
- Reservar alíquota para análise posterior por SDS-PAGE.

Obs: Para melhor eficiência deste protocolo as células provenientes da indução devem estar previamente congeladas em -20°C.

No caso de proteínas insolúveis, na lise devem ser evitados tampões contendo sais e método de lise por pressão. Além disso, induções em temperaturas mais baixas (25 ou 30°C) facilitam a etapa de solubilização.

2. Lavagem dos corpos de inclusão

Tampão 1

50 mM CAPS pH 11
5% Glicerol
1% Triton X-100
0.5% Deoxicolato
0.5% NP40
5 mM DTT
5 mM EDTA
0.5mM PMSF

Procedimento

- Ressuspender completamente o *pellet* no mesmo volume inicial (5mL/g de células) no tampão de lavagem 1;
- Sonicar 6x 20" amplitude 30% (para volume de 15-30 mL) ou 6x 10" para volumes menores de 15 mL, com intervalos de 45" entre os ciclos de sonicação;
- Centrifugar 15' 10.000 xg, 15°C;

d) Reservar alíquota para análise posterior por SDS-PAGE.

Tampão 2

50 mM CAPS pH11

1,5-2 M Ureia

0.5% Deoxicolato

5 mM DTT

5 mM EDTA

0.5 mM PMSF

Procedimento

- a) Ressuspender completamente o *pellet* no mesmo volume inicial (5mL/g de células) no tampão de lavagem 2;
- b) Sonicar 6x 20'' amplitude 30% (para volume de 15-30 mL) ou 6x 10'' para volumes menores de 15 mL, com intervalos de 45'' entre os ciclos de sonicação;
- c) Centrifugar 15' 10.000 xg, 15°C;
- d) Reservar alíquota para análise posterior por SDS-PAGE.

3. Solubilização dos corpos de inclusão

Tampão de Solubilização1

50 mM CAPS pH11

2M ureia

1% Deoxicolato

20 mM DTT (ou 20 mM BME)

2 mM EDTA

1 mM PMSF

Inibidor de protease 1x (Coquetel Roche)

Procedimento

- a) Ressuspender completamente o *pellet* no mesmo volume inicial (5mL/g de células) no tampão de solubilização;
- b) Incubar 24 horas a 25°C, 50-100 RPM;
- c) Sonicar 4x 10'' amplitude 30% (para volume de 15-30 mL) ou 4x 5'' para volumes menores de 15 mL, com intervalos de 45'' entre os ciclos de sonicação;
- d) Adicionar 1% de sulfato de estreptomicina (para remoção de ácidos nucleicos e de algumas proteínas contaminantes) e incubar em temperatura ambiente por 15 minutos sob agitação;
- e) Centrifugar 20' 20.000 xG, 4°C;
- f) Ressuspender o *pellet* no mesmo volume inicial em tampões compatível com o SDS-PAGE;
- g) Reservar alíquotas da fração solubilizada e da insolúvel para análise posterior por SDS-PAGE.

Caso a proteína de interesse ainda esteja presente no *pellet*, deve ser realizado uma etapa adicional de solubilização. Porém, há casos em que a proteína já pode estar solúvel na segunda lavagem.

Tampão de Solubilização²

50 mM CAPS pH11

1% N-LauroylSarcosyl

10 mM DTT (ou 20 mM BME)

2 mM EDTA

1 mM PMSF

Inibidor de protease 1x (Coquetel Roche)

Realizar o mesmo procedimento descrito para a primeira solubilização. Caso esta solubilização seja mais eficiente, não é necessário a realização da primeira, neste caso, utiliza-la como passo adicional de lavagem, seguindo neste caso o procedimento de lavagem, conforme descrito acima para esta etapa.

Obs: Com este protocolo é possível obter um bom grau de pureza da proteína recombinante, podendo eliminar uma etapa cromatográfica ou todas.

É possível a solubilização de até 100% da maioria das proteínas recombinantes dos corpos de inclusão de *E. coli*, porém, algumas proteínas requerem ainda um passo adicional de solubilização em 8M ureia ou 6M guanidina, no entanto, neste caso não há necessidade da cromatografia para purificação, pois nesta etapa a proteína se encontra com alto grau de pureza.

O detergente sarcosil previne a agregação das proteínas, consequentemente, sua precipitação, nos casos em que é necessária a redução ou retirada dos agentes caotrópicos. Neste caso deve ser usado a concentração de 0,2-0,5%, ou até 1% se for o caso.

ANEXO 2



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de ReferênciaComissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-18/16

Certificamos que o protocolo (P-29/15-3), intitulado "Produção de anticorpos policlonais contra o vírus sincicial respiratório humano para aplicação diagnóstica", sob a responsabilidade de MARCO AURELIO KRIEGER, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 16/05/2017 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 5 Machos de Swiss Webster, Idade: 45 Dia(s).
- 7 Fêmeas de Swiss Webster, Idade: 45 Dia(s).

Rio de Janeiro, 16 de maio de

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

ANEXO 3

***In silico* analysis of amino acid variation in human respiratory syncytial virus: insights into immunodiagnostics**

Claudemir Souza^{1,2,3}, Nilson IT Zanchin^{1,3}, Marco A Krieger^{1,2,3}, Adriana Ludwig^{1,2/+}

¹Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Carlos Chagas, Laboratório de Genômica Funcional, Curitiba, PR, Brasil

²Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

³Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Curitiba, PR, Brasil

BACKGROUND The highly contagious nature of human respiratory syncytial virus (HRSV) and the gravity of its infection in newborns and vulnerable adults pose a serious public health problem. Thus, a rapid and sensitive diagnostic test for viral detection that can be implemented upon the first appearance of symptoms is needed. The genetic variation of the virus must be considered for immunodiagnostic purposes.

OBJECTIVES To analyse HRSV genetic variation and discuss the possible consequences for capture immunoassay development.

METHODS We performed a wide analysis of N, F and G protein variation based on the HRSV sequences currently available in the GenBank database. We also evaluated their similarity with homologous proteins from other viruses.

FINDINGS The mean amino acid divergences for the N, F, and G proteins between HRSV-A and HRSV-B were determined to be approximately 4%, 10% and 47%, respectively. Due to their high conservation, assays based on the full-length N and F proteins may not distinguish HRSV from human metapneumovirus and other *Mononegavirales* viruses, and the full-length G protein would most likely produce false negative results due to its high divergence.

MAIN CONCLUSIONS We have identified specific regions in each of these three proteins that have higher potential to produce specific results, and their combined utilisation should be considered for immunoassay development.

Key words: HRSV - genetic variability - diagnostics - antigen detection

Human respiratory syncytial virus (HRSV) is one of the main causes of lower respiratory infections, which result in severe burden, especially in children, the elderly and adults with chronic health problems. While there is not an updated epidemiological census, the incidence rate of HRSV infection was reported in a study by Nair et al. (2010). They estimated that 33.8 million children younger than five years old were infected with HRSV in 2005, and at least 3.4 million of these children were hospitalised due to severe complications.

HRSV is an enveloped virus belonging to the *Pneumoviridae* family and the *Mononegavirales* order (Afonso et al. 2016) that has a negative sense single-stranded RNA genome encoding 11 proteins (Hacking & Hull 2002). The nucleocapsid (N), fusion (F) and attachment (G) proteins have been the main targets of therapeutic and diagnostic investigations (Buraphacheep et al. 1997, Terrosi et al. 2007, Green et al. 2015). The N protein binds strongly to viral RNA to form a helical structure (Buraphacheep et al. 1997). The F protein mediates fusion of the viral membrane with the host cell membrane, delivers viral RNA to

the cytoplasm, and fuses infected cell membranes with those of healthy cells, which results in syncytia formation (Hacking & Hull 2002). Together with the F protein, the HRSV G protein is responsible for binding host cell receptors and triggering infection (Melero et al. 1997). The G protein is a transmembrane glycoprotein that has an ectodomain containing two highly variable mucin-like regions (HVR1 and HVR2) that are also rich in glycosylation sites and immune epitopes (Melero et al. 1997).

Antigenic studies using monoclonal antibodies against the F and G proteins led to the initial distinction between the HRSV groups A and B. Subsequently, this virus was classified into genotypes based on the nucleotide variation of the G protein in the HVR2 region. Thus far, 14 genotypes have been identified for the HRSV-A group and 25 have been identified for the HRSV-B group (Hu et al. 2017, Zheng et al. 2017).

Early and accurate HRSV diagnosis is critical for preventive measures and patient treatment, and capture immunoassays can be performed faster than polymerase chain reaction (PCR)-based diagnostic assays. However, HRSV immunodiagnosis remains inefficient and problematic (Brendish et al. 2015, Koo et al. 2017) mostly because of false positive results from cross-reactivity with similar proteins of other viruses and false negative results due mostly to high viral population variation. Taking this into account, the search for specific diagnostic targets must consider the genetic variation of the target protein and the similarity to proteins of related viruses. For this purpose, we have analysed the HRSV N, F and G proteins currently available in the GenBank database. Spe-

doi: 10.1590/0074-02760170013

Financial support: IBMP grants obtained from FINEP (grant nº 01.11.0286.00), BNDES (grant nº 11.2.1328.1).

CS was supported by fellowships from CAPES and CNPq. AL was supported by a fellowship from CNPq. NITZ and MAK are research fellows from CNPq.

+ Corresponding author: adriana.ludwig@pq.cnpq.br

Received 12 January 2017

Accepted 16 May 2017

cifically, we have examined their amino acid (aa) variation within the HRSV taxId and their similarity to other respiratory viruses and have evaluated their potential use in or exclusion from immunodiagnostic applications.

MATERIALS AND METHODS

Sequence data, phylogenetic and divergence analyses - The aa sequences of the HRSV N, F and G proteins were retrieved from the GenBank database. Since there is a substantial number of partial sequences, we used all sequences that included complete aa coverage and partial entries containing a minimum of 70% sequence coverage (through November 2016). We initially retrieved 1102 sequences for the N protein, 1426 for the F protein and 701 for the G protein. The sequence datasets were aligned using the MUSCLE algorithm of MEGA 7.0 software (Kumar et al. 2016).

The high number of retrieved sequences made it impossible to generate a visually informative phylogeny tree. In addition, due the excessive redundancy of the datasets, we selected a defined number of representative sequences to evaluate the variability of the HRSV proteins at the aa level. Initial phylogenetic trees for the N and F proteins that included all sequences retrieved from GenBank were generated using the neighbour joining method with a 500 replicate bootstrap test. Representative sequences of the major clades were randomly chosen to construct the final phylogenies and for further analyses. Sequences that presented high divergence, which were evident by long branches, were also chosen. Moreover, strain reference sequences available in the NCBI taxonomy database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>) were also included. Finally, sequences from other related viruses were used as the outgroup to root the trees. For the G protein, high diversity is represented by the various genotypes that have been described. Thus, we opted to use one representative sequence from each genotype (with a minimum of 70% aa sequence coverage). Due to the high divergence of the G protein and consequential low similarity and poor alignment with its homologues from other viral species, we opted to present an unrooted tree. The G protein alignment was obtained by PSI-Coffee, which was designed to align distantly related proteins (Kemeny & Notredame 2009).

The final phylogeny for each protein was constructed by the maximum likelihood (ML) method using the aa substitution model indicated by the model selection. Bootstrap tests with 1,000 replicates for the N and F proteins and 500 replicates for the G protein were used to assess the reliability of the branches. Amino acid sequence divergences were obtained using p-distance, which calculates the number of aa differences per site between sequences, using the pairwise deletion option. All divergences and phylogenetic analyses were assessed using MEGA 7.0 software (Kumar et al. 2016).

HRSV similarity to other viruses - To evaluate the possible cross-reactivity of the HRSV in immunological tests, we investigated the similarity of the HRSV N, F and G proteins with their homologous proteins from other viruses that infect humans using NCBI BLASTP

searches. Since there are hundreds to thousands of entries for each virus, we used a strategy based on several rounds of taxon exclusion to access more distantly related viruses. We performed continuous taxon exclusion with a low stringency e-value cut-off of 1 until no additional significant hits were found. Additionally, BLASTP searches (e-value cut-off of 100) specifically against *Mononegavirales* respiratory viruses were performed to confirm the absence of similarity. The query sequences for the N and F proteins were P03418.1 and P03420.1, respectively. For the G protein, P03423.1 and O36633.1, corresponding to sequences from HRSV-A and HRSV-B, respectively, were used due to the high divergence found between these groups. The protein sequences corresponding to the best hits from each virus were aligned to the HRSV-A and HRSV-B sequences using PSI-Coffee (Kemeny & Notredame 2009).

RESULTS AND DISCUSSION

The N protein - N proteins are among the most abundant viral proteins of some *Mononegavirales* viruses, and they usually elicit a strong, and long-lasting humoral immune response in patients. N proteins are of special interest because they could be used for the development of simple and rapid laboratory diagnostic assays for direct virus detection in clinical specimens (Petraitytė-Burneikienė et al. 2011). These proteins also have strong species-specific patterns and can be good markers for early diagnosis (Li et al. 2015). The HRSV N protein is a 391-aa protein that homomultimerizes into a decameric ring that functions as a scaffold around which viral RNA associates to form nucleocapsids (Tawar et al. 2009, El Omari et al. 2011).

The HRSV N protein is highly conserved. It displays only a 1.89% overall mean aa divergence among the 1102 aa sequences analysed in this work. The maximum pairwise divergence value is 5.38% between the AJZ69754 (isolate = "VN-817-8/10", Vietnam) and AFX95846.1 (strain = "RSVA/GN435/11", South Korea) sequences. Alignment of the N protein sequences shows high conservation across the entire protein (Supplementary data, Fig. 1). The N protein phylogeny (Fig. 1A), which shows two major well-supported clades corresponding to HRSV-A and HRSV-B, revealed that the N protein is highly conserved as indicated by the short branch lengths. The mean divergence within the A and B groups is less than 1%, and the mean divergence between the groups is 4.3% (Fig. 1B).

To investigate the similarity of the HRSV N protein with its homologous counterparts from other human-infecting viruses, we performed serial NCBI BLASTP searches, which are summarised in Table I. Although this protein is highly conserved within HRSV, it shows significant similarity (61%) with only the N protein of the human metapneumovirus (HMPV), another *Pneumoviridae* respiratory virus. Based on sequence comparison, no significant hits were recovered for the HRSV N protein with other human-infecting *Mononegavirales* viruses, although it has been predicted to show secondary structure conservation (Barr et al. 1991).

The similarity between the N proteins of HRSV and HMPV mainly lies in the first 31 aa_s and in the region

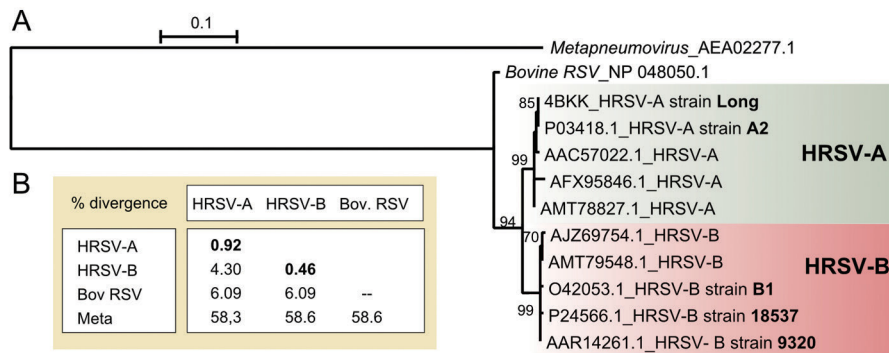


Fig. 1: analysis of the human respiratory syncytial virus (HRSV) N protein. (A) Maximum likelihood tree based on the JTT + I model. The bootstrap values are shown next to the branches (only greater than 50). The tree is drawn to scale, and the branch lengths are measured as the number of substitutions per site. The analysis involved 10 HRSV amino acid (aa) sequences, which are identified by their GenBank accession number and NCBI subgroup (in bold). The N protein of the bovine respiratory syncytial virus and human metapneumovirus were used as outgroup. (B) Mean aa divergence (based on p-distance) found between the major clades HRSV-A, HRSV-B and bovine respiratory syncytial virus (Bov RSV) and human metapneumovirus (Meta). The mean amino acid divergence found within the groups is shown in bold.

from aa 160 to the C-terminal end (Supplementary data, Fig. 2), which could implicate in possible serological cross-reactivity. Consequently, polyclonal antibodies against this protein or monoclonal antibodies against these regions are not appropriate for HRSV diagnosis. In fact, cross-reactivity between the N proteins of these viral species has already been described for polyclonal antibodies and for monoclonal antibodies against these two mentioned regions (Zhang et al. 2015). Alternatively, monoclonal antibodies against the region between aa_s 30-160 could specifically identify HRSV since this region is conserved only among HRSV sequences.

The F protein - The HRSV fusion glycoprotein F is a type I integral membrane protein that is synthesised as a 574-aa precursor, which is processed by a furin-like protease to excise a 27-residue glycosylated peptide (pep27), giving rise to the F2 (N-terminal region) and F1 (C-terminal region) polypeptides. These subunits are connected by two disulfide bonds and form a protomer that oligomerizes to form the mature trimeric F protein (Hacking & Hull 2002, McLellan et al. 2013). The presence of these two furin sites separated by pep27 is a specific feature of the F protein from HRSV (Bolt et al. 2000), although the basic F protein characteristics are shared with other *Pneumoviridae* and *Paramyxoviridae* family members. During cell entry, F glycoproteins undergo a conformational change that brings the viral and cellular membranes into proximity, ultimately leading to their fusion (Swanson et al. 2011).

A total of 1426 aa F protein sequences were analysed. The overall mean aa divergence is 4.66%, and the maximum pairwise divergence value is 15.98% between the AHA61614.1 (isolate = "B6-9918", Taiwan) and AHA61607.1 (isolate = "A10-6030", Taiwan) sequences. Alignment of the selected F protein sequences is shown in Supplementary data, Fig. 3. The signal peptide presents the highest divergence (mean of 35%), while the F1 and F2 subunits appear to be more conserved (divergence mean of 3.3% and 4.6%, respectively).

The F protein phylogeny, shown in Fig. 2A, was constructed based on 22 selected HRSV sequences. As expected, two well-supported groups are evident from the F protein tree, reflecting the separation of HRSV-A and HRSV-B. The mean divergence found within each group is nearly 4%, while the mean divergence between groups A and B is 10.1% (Fig. 1B). Phylogeny analysis revealed that two sequences that were deposited in GenBank as belonging to the HRSV-B group (AEN74947.1 and AHG54515.1) fell in the HRSV-A clade. Since HRSV classification is based mostly on the G protein, a possible explanation for this finding is the occurrence of recombination between co-circulating HRSV-A and HRSV-B. However, although recombination is common for some types of viruses, it is rare for HRSV, and it is most likely that these potential recombinants are due to either PCR or sequence assembly artifacts (Tan et al. 2012).

Although the HRSV F protein is less conserved than the HRSV N protein, it presents significant similarity with F proteins of a higher number of viruses (Table I). The F protein most similar to that of HRSV is from HMPV, sharing 36% identity and 59% similarity and length coverage of 88% of the aa sequence. Two segments of the F protein are more conserved in these viruses (Supplementary data, Fig. 4), including a region of 29 aa_s (positions 36 to 64 of the HRSV F protein) that has 53% identity and 84% similarity and a central region of 16 aa_s that has 81% identity and 100% similarity (positions 303 to 318 of the HRSV F protein). The most divergent regions are the signal peptide and the region from aa_s 100 to 130.

According to the F protein BLASTP scores, the viruses identified as having similar F proteins are human parainfluenza virus 3, the Nipah virus, the Hendra virus and the measles virus. All of these viruses are from *Paramyxoviridae*, a related family of the *Mononegavirales* order (Afonso et al. 2016). However, the similarity and/or extensions of the BLAST alignment results are not high. The alignments are shown in Supplementary data, Figs 5-8 and illustrate only a few short regions that are well-conserved. No additional human-infecting viruses show

TABLE I
Summary of BLASTP results for N, F and G proteins against the NCBI non-redundant protein database.
Only the best hit against human-infecting viruses were considered

Order	Family	Genus	Species	Extension	e-value	Identity	Similarity	Ac Number	Alignment position
Mononegavirales	Pneumoviridae	Metapneumovirus	Human metapneumovirus	99%	4e-101	42%	61%	AEA02277.1	1-388
Mononegavirales	Pneumoviridae	Metapneumovirus	Human metapneumovirus	88%	2e-119	36%	59%	AGL74059.1	14-519
		Respirovirus	Human parainfluenza virus 3	66%	8e-09	19%	40%	NP_067151.1	133-516
	Paramyxoviridae	Henipavirus	Nipah virus	19%	0.055	29%	51%	AA43915.1	139-251
		Henipavirus	Hendra virus	75%	0.14	21%	38%	AEQ38114.1	139-569
		Morbillivirus	Measles virus	17%	0.061	25%	54%	ABY58017.1	115-214
G protein									
No significant similarity to other Human-infecting viruses									

Extension: the percentage of alignment length with the query sequence; Ac: Genbank accession number; alignment position: the amino acid position of the alignment extension in relation to the query.

significant similarity with the HRSV F protein. Nevertheless, polyclonal antibodies against the HRSV F protein could produce cross-reactivity to these viruses and should be avoided for diagnostic purposes. We identified only two short regions of the HRSV F protein (aa_s 97-109 of F2 and 417-428 of F1) that are highly divergent in relation to other viruses and could thus be used for specific monoclonal antibody development to avoid cross-reactivity.

We also closely analysed the F1 region between aa_s 254-277, which corresponds to the epitope of the palivizumab antibody (MEDI-493, Synagis, MedImmune Inc., Gaithersburg, MD). Palivizumab has been used since 1998 for preventing infection in children who have a substantial risk of developing severe forms of HRSV disease (Eiland 2009). The palivizumab epitope consists of a structural helix-loop-helix motif that has discontinuous residues within a 20-residue linear peptide (Corti et al. 2013, McLellan 2015). Among the *Mononegavirales* human-infecting species, only the HMPV F protein is relevantly conserved in this region with the HRSV F protein (Fig. 1C), as the linear sequence alignment shows 37% identity and 58% similarity. However, the possible antibody contacts with this type of discontinuous epitope make it difficult for reliable cross-reaction prediction.

The G protein - The HRSV G protein has a variable sequence length ranging from 282 to 321 aa_s depending on the genotype and has no sequence similarity with other *Mononegavirales* attachment proteins (Cui et al. 2013). It is highly glycosylated, containing 30-40 O-linked glycans and 4-5 N-linked glycans, which potentially constitutes up to 60% of the G protein molecular mass (Cui et al. 2013, McLellan et al. 2013).

The overall mean aa divergence among the 701 G protein sequences analysed is 27.6%, which is consistent with the expected low conservation. The maximum pairwise divergence value is 61.4% between the AIF71060.1 (HRSV-B, isolate = "MI_B_55_12_12", Italy) and P27021.1 (HRSV-A, strain RSB642) sequences. As mentioned above, the high divergence found for the G protein is represented by numerous distinct genotypes, with 14 genotypes assigned to HRSV-A (NA1-NA4, GA1-GA7, SAA1, CB-A, and ON1) and 25 genotypes for assigned to HRSV-B (BA1-BA12, BA-C, SAB1-SAB4, GB1-GB4, URU1-2, CB-B, CB1) (Hu et al. 2017, Zheng et al. 2017). The genotypes that had only short, partial sequences available (HRSV-A: GA6 and SAA1; HRSV-B: BA6, BA8, BA11, SAB2 and URU1) were excluded from our analyses, and the phylogeny was inferred using 32 G protein sequences representing different genotypes (12 genotypes from HRSV-A and 20 from HRSV-B).

Fig. 3A shows the unrooted phylogeny of the HRSV G protein, which was constructed based on the entire protein. Presumably, two clades separate the HRSV-A and HRSV-B sequences, and the long branches suggest high divergence among the sequences. The relationships among the genotypes are not clear since the bootstrap values for most nodes are very low (< 50). This lack of resolution is not relevant to the main purpose on this work, and it may reflect the non-dichotomous nature of the HRSV lineage split. The mean divergence found

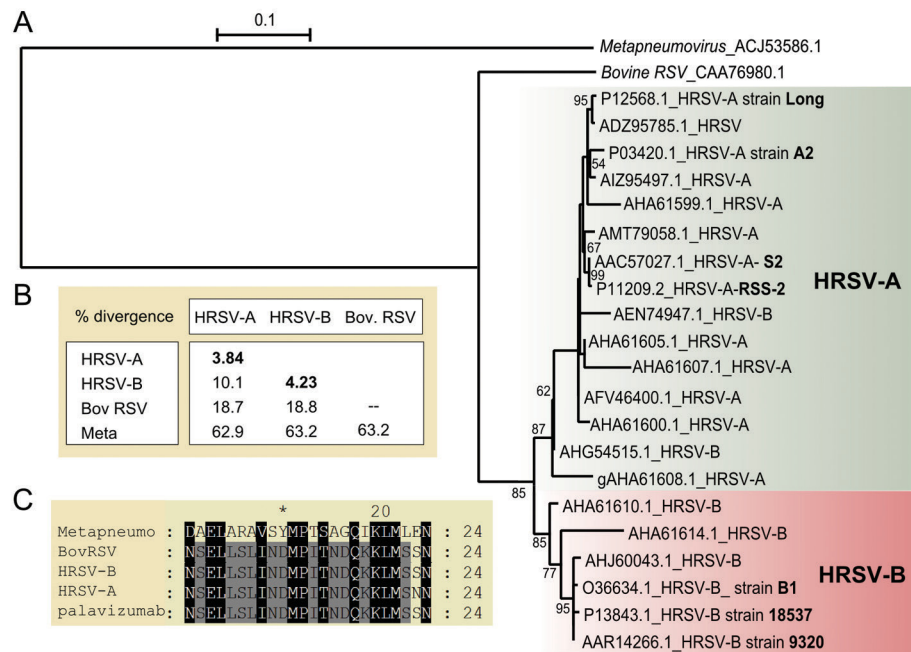


Fig. 2: analysis of the human respiratory syncytial virus (HRSV) F protein. (A) Maximum likelihood tree based on the JTT + G model. The bootstrap value is shown next to the branch (only greater than 50). The tree is drawn to scale, and the branch lengths are measured as the number of substitutions per site. This analysis involved 22 HRSV amino acid (aa) sequences, which are identified by their respective GenBank accession number and NCBI subgroup (in bold). The F protein from bovine respiratory syncytial virus and human metapneumovirus were used as outgroups. (B) Mean aa divergence (based on p-distance) found between the major clades HRSV-A and HRSV-B and the outgroup sequences from bovine respiratory syncytial virus (Bov RSV) and human metapneumovirus (Meta). The mean aa divergence found within the groups is shown in bold. (C) Amino acid sequence alignment of the palivizumab-specific antibody epitope (254-277 aa). One sequence from HRSV-A, HRSV-B, bovine respiratory syncytial virus and human metapneumovirus is represented in the alignment.

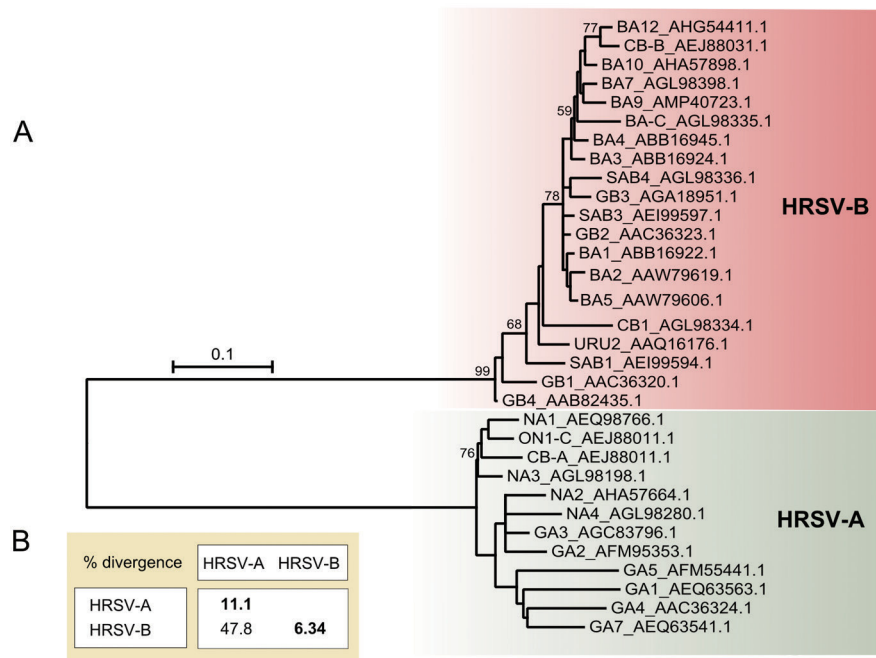


Fig. 3: analysis of the human respiratory syncytial virus (HRSV) G protein. (A) Maximum likelihood unrooted tree based on the JTT + G model. The bootstrap value is shown next to the branch (only greater than 50). The tree is drawn to scale, and the branch lengths are measured as the number of substitutions per site. The analysis involved 32 HRSV amino acid (aa) sequences, which are identified by their genotype followed by their GenBank accession number. (B) Mean aa divergence (based on p-distance) found between the major clades HRSV-A and HRSV-B. The mean aa divergence found within the groups is shown in bold.

TABLE II

Amino acid divergence pattern of the G protein distinct regions among human respiratory syncytial virus (HRSV) sequences

Region	Conserved region I	HVR1	Central conserved region	HVR2
Position	1-73 aa	74-156 aa	157-194 aa	195- last aa
Overall mean divergence	7.7%	38%	15.5%	35%
Higher pairwise distance	16.44%	71.1%	31.6%	66.3%
Mean divergence within HRSV-A group	2.19%	14.4%	1.91%	18.4%
Mean divergence within HRSV-B group	2.10%	7.61%	0.33%	11.0%
Mean divergence between HRSV-A and HRSV-B groups	13.47%	67.1%	30.5%	57.3%

The analysis involved 28 amino acid (aa) sequences (11 from HRSV-A and 17 from HRSV-B). HVR: highly variable mucin-like regions.

within the A and B groups is 11.1% and 6.34%, respectively, and the mean divergence between these groups is 47.8% (Fig. 3B), which are similar to the values described in previous studies (Melero et al. 1997).

Fig. 4 shows the alignment of the selected G protein sequences. The G protein can be divided into four regions that represent various levels of divergence: conserved region I, HVR1, a central conserved region and HVR2. A summary of aa divergence from these regions is presented in Table II. The low variation of conserved region I and the central conserved region contrasts with the high variation of the remaining G protein regions. The central conserved region has 13 aa, that are identical in all the sequences analysed. Between groups A and B, the mean divergence for HVR1 and HVR2 is 67.1% and 57.3%, respectively. Variation in these regions within group A is 14.4% and 18.4%, respectively. The sequence divergence is lower in group B, with a mean of 7.61% for HVR1 and 11% for HVR2. Differences in HVR1 are caused mainly by aa substitutions, while the differences in HVR2 are caused by both aa substitutions and the insertion and deletion of sequence segments (Cui et al. 2013). Thus, these regions are not suitable targets for prevention (Tan et al. 2013) and diagnosis since they could generate false negative results. In contrast, the 13-aa central conserved region would be an excellent target for diagnosis and prevention. This region (residues 164-176) is unglycosylated and universally conserved among all clinical isolates (Maifeld et al. 2016). In fact, monoclonal antibodies against this region have been shown to successfully block HRSV infection and disease (Jorquera et al. 2016).

The high divergence of the HRSV G protein is also reflected in its divergence from other viruses. No significant similarities were found to other human-infecting viruses (Table I). The absence of linear and structural similarity (Melero et al. 1997) of the HRSV G protein to other *Mononegavirales* attachment proteins probably prevents cross-reactivity.

Genetic variability and HRSV diagnostic tests - Available HRSV conventional diagnostic methods include viral culture, viral antigens detection by direct or indirect immunofluorescent (IF) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and viral nucleic acid detection by reverse transcription-PCR (RT-PCR) (Popow-

Kraupp & Aberle 2011). Although these methods are useful, they require costly equipment and reagents and/or trained operators and can be time consuming, restricting their use to large centres since they are not available in all hospitals and cities. Additionally, clinical sample quality has a direct impact on the sensitivity and specificity of these assays (Popow-Kraupp & Aberle 2011).

An ideal test for this disease should be rapid, inexpensive, easy to handle and compatible with use in remote areas that have no laboratory infrastructure. This can be achieved using immunochromatographic membrane assays designed with capture antibodies optimised for HRSV proteins, which could be the first test performed in acutely-infected patients, allowing for quick contention measures to be taken. A second confirmatory test could be subsequently performed, preferable for genotype identification and for treatment decisions.

The challenges of HRSV immunodiagnostics are related to the false positive results caused by cross-reactivity and false negative results due to viral population variation or low-quality clinical samples. We analysed the HRSV proteins reported to be the most immunogenic in terms of their genetic variation among the HRSV genotypes and their similarity to other respiratory viruses and evaluated their potential use in or exclusion from diagnostic applications. It is important to note that the analyses described herein were performed using linear alignment of the aa sequences, which was meant to be a starting point for the development of diagnostic monoclonal antibodies and to be complemented by other methods, including further epitope mapping and three-dimensional structural protein analysis.

HRSV proteins have various levels of genetic variation, with the N protein being extremely conserved and the F protein showing intermediate variation. The G protein, however, plays central role in the dynamics of HRSV genetic variation. This protein has a high capacity for harbouring long insertions without affecting its function, a feature that is related to the structural flexibility of its mucin-like domains, which allows for fast evolutionary changes. Changes in these domains may alter the glycosylation pattern and thus change the viral antigenic properties (Cui et al. 2013). Due to its high genetic and antigenic divergence, determined from numerous sequences isolated worldwide, the G protein has

G protein alignment

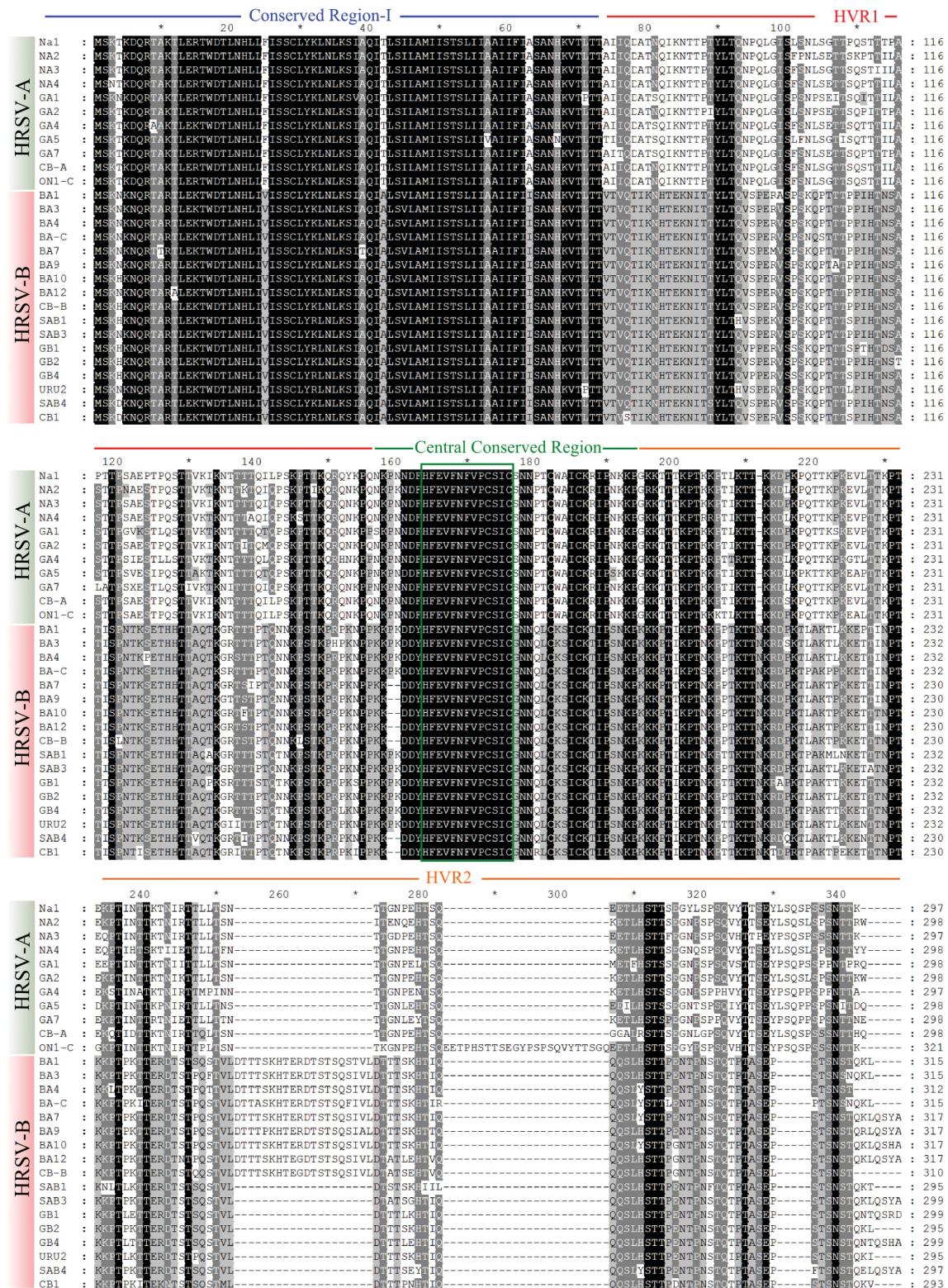


Fig. 4: amino acid (aa) alignment view of the G protein from the selected human respiratory syncytial virus (HRSV) sequences representing different genotypes. The sequences are identified by their genotype. The GenBank accession number of the sequences can be found on the G protein phylogeny. Of the 32 selected sequences, incomplete sequences were excluded (GA3, GB3, BA2 and BA5). The HRSV-A and HRSV-B sequences are specified on the left. The conserved region I, HVRI, the central conserved region and HVR2 are indicated by blue, red, green and orange lines, respectively. The green box denotes the 13-aa segment (164-176 aa) from the central conserved region that is identical in all HRSV genotypes.

become a model system for studies on epidemiology and pathogen evolution (Cane 2007). The appearance of the novel genotypes may help HRSV escape immunity acquired from previous infections, influence infection severity and cause novel outbreaks (Cui et al. 2013).

Based on our analyses, we suggest that the conserved central region of the G protein and the specific regions of the F and N proteins described above seem the most suitable segments for the development of monoclonal antibodies for diagnostic applications. These antibodies could be used for capture of viral particles and viral proteins that are recommended for the acute phase of infection. Cross-reactivity could most likely occur with the N and F proteins of HMPV, a common, related respiratory pathogen found worldwide. This false positive result could be easily ruled out by a parallel G protein negative result, which could be interpreted as an infection by other *Mononegavirales* viruses. Thus, combined use of these regions could provide the basis for improving HRSV immunodiagnosis by diminishing both false negative results and cross-reactivity.

AUTHORS' CONTRIBUTION

CS performed the GenBank searches and amino acid recovery; CS and AL carried out BLASTP, phylogenetic and divergence analyses; CS, AL and NITZ analysed the results and wrote the manuscript; MAK assisted in analysis of the results and manuscript writing; NITZ and MAK provided the funding and facilities for the study. All authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

- Afonso CL, Amarasinghe GK, Bányaí K, Bào Y, Basler CF, Bavari S, et al. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Arch Virol*. 2016; 161(8): 2351-60.
- Barr J, Chambers P, Pringle CR, Easton AJ. Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumonia virus of mice: sequence comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of pneumoviruses, paramyxoviruses, rhabdoviruses and filoviruses. *J Gen Virol*. 1991; 72(3): 677-85.
- Bolt G, Pedersen LO, Birkeslund HH. Cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is required for its surface expression: role of furin. *Virus Res*. 2000; 68(1): 25-33.
- Brendish NJ, Schiff HF, Clark TW. Point-of-care testing for respiratory viruses in adults: the current landscape and future potential. *J Infect*. 2015; 71(5): 501-10.
- Buraphacheep W, Britt WJ, Sullender WM. Detection of antibodies to respiratory syncytial virus attachment and nucleocapsid proteins with recombinant baculovirus-expressed antigens. *J Clin Microbiol*. 1997; 35(2): 354-7.
- Cane P. Molecular epidemiology and evolution of RSV. In: Cane P, editor. *Respiratory syncytial virus*. Amsterdam: Elsevier; 2007. p. 89-114.
- Corti D, Bianchi S, Vanzetta F, Minola A, Perez L, Agatic G, et al. Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. *Nature*. 2013; 501(7467): 439-43.
- Cui G, Zhu R, Qian Y, Deng J, Zhao L, Sun Y, et al. Genetic variation in attachment glycoprotein genes of human respiratory syncytial virus subgroups A and B in children in recent five consecutive years. *PLoS ONE*. 2013; 8(9): e75020.
- Eiland LS. Respiratory syncytial virus: diagnosis, treatment and prevention. *J Pediatr Pharmacol Ther*. 2009; 14(2): 75-85.
- El Omari K, Dhaliwal B, Ren I, Abrescia NG, Lockyer M, Powell K, et al. Structures of respiratory syncytial virus nucleocapsid protein from two crystal forms: details of potential packing interactions in the native helical form. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2011; 67(Pt 10): 1179-83.
- Green CA, Scarselli E, Voysey M, Capone S, Vitelli A, Nicosia A, et al. Safety and immunogenicity of novel respiratory syncytial virus (RSV) vaccines based on the RSV viral proteins F, N and M2-1 encoded by simian adenovirus (PanAd3-RSV) and MVA (MVA-RSV); protocol for an open-label, dose-escalation, single-centre, phase 1 clinical trial in healthy adults. *BMJ Open*. 2015; 5(10): e008748.
- Hacking D, Hull J. Respiratory syncytial virus - viral biology and the host response. *J Infect*. 2002; 45(1): 18-24.
- Hu P, Zheng T, Chen J, Zhou T, Chen Y, Xu X, et al. Alternate circulation and genetic variation of human respiratory syncytial virus genotypes in Chengdu, West China, 2009-2014. *J Med Virol*. 2017; 89(1): 32-40.
- Jorquera PA, Anderson L, Tripp RA. Understanding respiratory syncytial virus (RSV) vaccine development and aspects of disease pathogenesis. *Expert Rev Vaccines*. 2016; 15(2): 173-87.
- Kemena C, Notredame C. Upcoming challenges for multiple sequence alignment methods in the high-throughput era. *Bioinformatics*. 2009; 25(19): 2455-65.
- Koo B, Eun C, Yoon T, Hoon J, Kyoung M, Sung H, et al. An isothermal, label-free, and rapid one-step RNA amplification/detection assay for diagnosis of respiratory viral infections. *Biosens Bioelectron*. 2017; 90: 187-94.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. 2016; 33(7): 1870-4.
- Li K, Bai Z, Zhu H, Di B. Prospective evaluation of rapid antigen tests for diagnosis of respiratory viral pathogens. *Transplant Proc*. 2015; 47(6): 1790-5.
- Maifeld SV, Bodrey R, Mok H, Chu M, Yu L, Yamagata R, et al. Development of electrochemiluminescent serology assays to measure the humoral response to antigens of respiratory syncytial virus. *PLoS ONE*. 2016; 11(4): e0153019.
- McLellan JS, Ray WC, Peeples ME. Structure and function of respiratory syncytial virus surface glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013; 372: 83-104.
- McLellan JS. Neutralizing epitopes on the respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *Curr Opin Virol*. 2015; 11: 70-5.
- Melero JA, García-Barreno B, Martínez I, Pringle CR, Cane PA. Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. *J Gen Virol*. 1997; 78(10): 2411-8.
- Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010; 375(9725): 1545-55.
- Petraitytė-Burneikienė R, Nalivaiko K, Lasickienė R, Firantienė R, Emužytė R, Sasnauskas K, et al. Generation of recombinant metapneumovirus nucleocapsid protein as nucleocapsid-like particles and development of virus-specific monoclonal antibodies. *Virus Res*. 2011; 161(2): 131-9.

- Popow-Kraupp T, Aberle JH. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection. *Open Microbiol J*. 2011; 5: 128-34.
- Swanson KA, Settembre EC, Shaw CA, Dey AK, Rappuoli R, Mandl CW, et al. Structural basis for immunization with postfusion respiratory syncytial virus fusion F glycoprotein (RSV F) to elicit high neutralizing antibody titers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(23): 9619-24.
- Tan L, Coenjaerts FE, Houspie L, Viveen MC, van Bleek GM, Wiertz EJ, et al. The comparative genomics of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: genetic variability and molecular evolutionary dynamics. *J Virol*. 2013; 87(14): 8213-26.
- Tan L, Lemey P, Houspie L, Viveen MC, Jansen NJ, van Loon AM, et al. Genetic variability among complete human respiratory syncytial virus subgroup A genomes: bridging molecular evolutionary dynamics and epidemiology. *PLoS ONE*. 2012; 7(12): e51439.
- Tawar RG, Duquerroy S, Vonnheim C, Varela PF, Damier-Piolle L, Castagné N, et al. Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science*. 2009; 326(5957): 1279-83.
- Terrosi C, Di Genova G, Savellini GG, Correale P, Bardi P, Cusi MG. Immunological characterization of respiratory syncytial virus N protein epitopes recognized by human cytotoxic T lymphocytes. *Viral Immunol*. 2007; 20(3): 399-406.
- Zhang Y, Pohl J, Brooks WA, Erdman DD. Serologic cross-reactions between nucleocapsid proteins of human respiratory syncytial virus and human metapneumovirus. *J Clin Microbiol*. 2015; 53(5): 1609-15.
- Zheng Y, Liu L, Wang S, Li Z, Hou M, Li J, et al. Prevailing genotype distribution and characteristics of human respiratory syncytial virus in northeastern China. *J Med Virol*. 2017; 89(2): 222-33.